INDIAN AGRICULTURAL RESEARCH INSTITUTE
LIBRARY
New Delhi

Call No.

Acc. No. 99727.

ARCHIV
FÜR
MIKROBIOLOGIE

ZEITSCHRIFT FÜR DIE ERFORSCHUNG
DER PFLANZLICHEN MIKROORGANISMEN

ELFTER BAND



BERLIN
VERLAG VON JULIUS SPRINGER
1940

ARCHIV
FÜR
MIKROBIOLOGIE

ZEITSCHRIFT FÜR DIE ERFORSCHUNG DER PFLANZLICHEN MIKROORGANISMEN

BEGRÜNDET VON

J. BEHRENS F. BOAS A. RIPPEL

UNTER MITWIRKUNG VON

CHR. BARTHEL-STOCKHOLM · W. BAVENDAMM-DRESDEN-THARANDT · F. BOAS-MÜNCHEN · H. BORTELS-BERLIN · T. CASTELLI-PERUGIA · W. CUTLER-ROTHAMSTED V. CZURDA-PRAG · D. FEHER-SOPRON · E. B. FRED-MADISON · F. FUHRMANN-GRAZ C. GORINI-MAILAND · J. GROENEWEGE-KOETARADJA · A. GUILLIERMOND-PARIS O. HAGEM-BERGEN · A. JANKE-WIEN · S. KRZEMIENIEWSKI-LEMBERG · PH. LASSEUR-NANCY · E. MELIN-UPPSALA · A. PASCHER-PRAG · B. PEYRONEL-FLORENZ · O. RAHN-ITHACA · GINO DE ROSSI-PERUGIA · K. SAITO-OSAKA · W. H. SCHOPFER-BERN W. SCHWARTZ-KARLSRUHE · C. STAPP-BERLIN · H. TAMIYA-TOKIO · F. TOBLER DRESDEN · S. WINOGRADSKY-PARIS

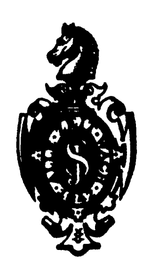
HERAUSGEGEBEN VON

A. RIPPEL

GÖTTINGEN

ELFTER BAND

MIT 119 TEXTABBILDUNGEN



BERLIN
VERLAG VON JULIUS SPRINGER
1940

Unveränderter Nachdruck 1968
Springer-Verlag, Berlin / Heidelberg / New York

Fotodruck: Mikrokopie GmbH. · München 22 · Bruderstraße 9

Inhalt des 11. Bandes.

Erstes Heft.

Abgeschlossen am 4. April 1940.

Zweites Heft.

Abgeschlossen am 13. Juni 1940.

Drittes Heft.

Abgeschlossen am 30. September 1940.

Viertes Heft.

Abgeschlossen am 24. Dezember 1940.

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.)

Über die Verbreitung von Aspergillus niger, insbesondere in Deutschland[1].

Von

August Rippel.

(Eingegangen am 1. Dezember 1939.)

Über die Verbreitung von niederen Pilzen und von Bakterien im Boden, als Grundlage einer Ökologie der Mikroorganismen, ist noch recht wenig bekannt, namentlich, wenn man nach *quantitativen* Angaben fragt. Unter den *Bakterien* hat man einige landwirtschaftlich wichtige Formen in dieser Hinsicht etwas genauer untersucht, und zwar solche, die sich durch einen Spezialstoffwechsel auszeichnen: denn durch diese Eigenschaft ist die Möglichkeit gegeben, einen Elektivnährboden zu verwenden, auf dem das Vorhandensein der betreffenden Form oder der betreffenden Formen leicht erkannt und mit Hilfe des Verdünnungsverfahrens auch einigermaßen quantitativ festgestellt werden kann, wobei vornehmlich die Bedeutung der Acidität für das Vorkommen untersucht wurde. Es handelt sich um *Stickstoffbinder*, *Nitrifikanten*, *Schwefelbakterien*, *Cellulosezersetzer* u. a., somit zumeist um physiologische Gruppen, nicht immer um Einzelformen, wie es z. B. für *Azotobacter chroococcum* zutrifft. Hier liegen auch eingehende Untersuchungen von *Niemeyer* und von *Wenzl* vor, die vor allem deshalb von Interesse sind, weil sie sich nicht allein auf landwirtschaftlich oder forstlich genutzte Flächen erstrecken, sondern systematisch die Verbreitung in Natur- und Kulturböden eines bestimmten Gebietes zu erforschen suchen. Dabei ergab sich u. a., daß nicht nur die Acidität sondern auch z. B. die Durchlüftung für die Verbreitung dieses Bakteriums wichtig sind. Nach *van Niel* und *Bortels* ist auch das Vorhandensein von Molybdän für das Vorkommen von *Azotobacter* wesentlich. Damit sind also schon eine Reihe von ökologischen Faktoren bekannt, die auf die Verbreitung von Mikroorganismen einwirken, wobei jedoch nicht auf weitere Einzelheiten eingegangen sei.

Von heterotrophen Bakterien ohne Spezialstoffwechsel hat man wohl nur bei *Bacillus mycoides* die Verbreitung, auch auf kleinstem Raum und ebenfalls auf Natur- und Kulturböden, untersucht (*Grund-*

[1] Für mannigfache Hilfe bin ich Fräulein *E. Loebeling* und Herrn Dr. *K. Nabel* zu besonderem Dank verpflichtet, ebenso Fräulein Dr. *K. Pietschmann* für die Herstellung der S. 24 erwähnten Einsporkulturen.

mann). Bei diesem Organismus liegen die Verhältnisse infolge der morphologischen Eigenart des Organismus, der auf Platten leicht erkannt werden kann, besonders günstig. Auch auf die Untersuchungen von *Janke* und *Wozak* sei noch hingewiesen, in denen das Gebiet um den Lunzer See in seinen verschiedenen Höhenlagen nach Bakterienarten untersucht wurde, sowie auf die von *Fehér* nach regionalen Gesichtspunkten gegebene Pilz- und Bakterienliste von Waldböden. Im übrigen sei auf die zahlreichen sonstigen Einzelangaben von bestimmten Standorten nicht eingegangen.

Für die mikroskopischen *Pilze* (von den *Basidiomyceten*, insbesondere den *Hymenomyceten*, ebenso von den parasitären Pilzen sei hier abgesehen) liegen zwar ebenfalls eine Fülle von Einzelbeobachtungen vor, wie sie z. B. bei *Niethammer* (2) und *Rippel* zusammengestellt sind, aber es fehlen systematische Untersuchungen über größere oder kleinere Gebiete, wenn man die Forderung stellt, daß diese Untersuchungen so vorgenommen sind, daß bestimmte Formen auch unter allen Umständen erkannt und wenigstens annähernd quantitativ vergleichbare Angaben gemacht werden können. Zweifellos liegen die Verhältnisse nicht einfach: Die Art und Weise der Isolierung bzw. Anreicherung bedingt, daß man mit der ganzen Fülle der vorkommenden Pilze zu rechnen hat. Je nach der Menge der sonstigen Formen oder auch Bedingungen wird eine bestimmte Form leicht der Beobachtung entgehen können, falls nicht mit einem solchen Arbeitsaufwand gearbeitet wird, wie er technisch meist gar nicht möglich sein dürfte. So fehlt z. B. in den sonst eingehenden Angaben von *Fehér* über Waldböden *Aspergillus niger*, das Untersuchungsobjekt der vorliegenden Mitteilung, in der Liste der Pilze völlig, trotz der Zahl von 21 untersuchten Böden von Ungarn bis Norwegen. Dabei ist der Pilz, wie meine Untersuchungen zeigten, in den ungarischen Waldböden sehr häufig und kommt auch in Norwegen vor. Auf weitere Literaturangaben wird unten (S. 27) zurückzukommen sein.

Methodik.

Für die Kenntnis von der ökologischen Bedingtheit des Vorkommens der Bodenpilze wäre es also sehr erwünscht, eine Methode zu besitzen, die es erlaubt, eine bestimmte Form unter allen Umständen, auch bei seltenem Vorkommen, zu erkennen. Diese Möglichkeit besteht offenbar bei *Aspergillus niger*, da für diesen Pilz eine Elektivnährlösung — hochprozentige Tanninnährlösung — bekannt ist, vermittelst deren das möglich ist. Man konnte also erwarten, daß man mit einer darauf aufgebauten Methode quantitative Zahlen über das Vorkommen des Pilzes erhalten könnte, die naturgemäß auch von allgemeinerem bodenökologischen Interesse sein würden. Diese Erwartung hat sich denn auch erfüllt, wenn allerdings auch hier schon hervorgehoben sei, daß

die verwendete Methodik noch recht roh ist und nur erste Anhaltspunkte für unsere Frage ergibt. Aber die Ergebnisse lassen unzweifelhaft erkennen, daß man in dieser Richtung weiterkommen wird, wenn die hier gemachten mehr summarisch zu bewertenden Beobachtungen im einzelnen weiterverfolgt werden. Die späteren Ausführungen dürften zeigen, daß sich das lohnen würde. Ich befinde mich hier in einer ähnlichen Lage wie *Leischner-Siska* (bzw. *Höfler*) hinsichtlich der *Basidiomyceten*, nämlich zunächst die grundsätzliche Brauchbarkeit einer Methode zu zeigen. Nur handelt es sich hier um die regionale Verbreitung, nicht um die Verbreitung auf einem beschränkten Standort.

Von *Aspergillus niger* ist seit *van Tieghem* bekannt, daß dieser Pilz besonders starke Konzentrationen von Tannin verträgt und diesen Stoff als einzige Kohlenstoffquelle verwerten kann, und weitere Untersuchungen von *Knudson*, *Koch* und *Oelsner*, *Rippel* und *Keseling* sowie von *Stapp* und *Bortels* bestätigten, daß der Pilz bedeutend höhere Tanninkonzentrationen verträgt als andere Pilze. Man braucht also lediglich eine Nährlösung herzustellen, die als einzige Kohlenstoffquelle Tannin in hoher Konzentration enthält und kann dann erwarten, daß darin allein *Aspergillus niger* zur Entwicklung gelangt, was schon *Koch* und *Oelsner* mitteilten, die indessen nicht weiter gingen als lediglich bis zur Isolierung des Pilzes. Vorversuche mit einer Reinkultur ergaben als günstigste Konzentration 20 % Tannin. Höhere Konzentrationen sind natürlich ebenfalls brauchbar; doch verzögert sich die Entwicklung stark, was für Massenuntersuchungen, wie sie bei einer Fragestellung wie der vorliegenden nötig sind, von wesentlichem Nachteil ist. Sehr nützlich erwies sich noch ein Zusatz von 0,5 % Rohrzucker, wodurch die Entwicklung erheblich beschleunigt wurde. So verwendete ich schließlich folgende Nährlösung: $MgSO_4$ 0,125 %, KH_2PO_4 0,25 %, $(NH_4)_2SO_4$ 1,0 %, $ZnSO_4$ 0,005 %, Rohrzucker 0,5 %. Zur fertigen Lösung wurden 20 % Tannin gegeben. In dieser Lösung wächst der Pilz anfänglich meist schwammig-untergetaucht; später bricht das Mycel nach der Oberfläche der Lösung durch und bildet dann eine Decke.

Stets wurden 50 ccm Nährlösung in 200er Kölbchen aus Jenaer 20er Glas verwendet. Nach einmaliger Sterilisation im Dampftopf wurde mit Erde geimpft. Die Kolben wurden im Brutzimmer bei etwa 30° C aufgestellt. Eine genaue Innehaltung der Temperatur war hier nicht möglich; ein Aufstellen im Thermostaten kam aber wegen der Massenuntersuchungen nicht in Frage. Immerhin handelt es sich hier nur um die Feststellung des tatsächlichen Vorhandenseins des Pilzes, so daß gewisse Temperaturschwankungen in Kauf genommen werden konnten. Wo die Schnelligkeit der Entwicklung verglichen wurde (S. 17), sind nur gleichzeitig erhaltene Ergebnisse verwertet.

Die Entnahme der Bodenproben gestaltete sich so, daß anfänglich an den verschiedensten Örtlichkeiten je eine Bodenprobe entnommen wurde, später zwei an der gleichen Stelle im Abstand von 5 m; die Ergebnisse dieser Proben finden sich in Tabelle II. Schließlich wurden an der gleichen Örtlichkeit fünf oder zehn Proben im Abstand von je 5 m entnommen, wobei die einzelnen Proben in einer geraden Linie lagen; die Ergebnisse dieser Proben finden sich in Tabelle I. Aus jeder Probe wurden zwei Kolben geimpft, so daß die Zahlen in Tabelle I die Ergebnisse von 10 oder 20 Proben der gleichen Örtlichkeit sind, wenn jede Probe doppelt gezählt wird, entsprechend

der Impfung von je zwei Kolben. Daß dies zulässig ist, geht daraus hervor, daß bei Vorhandensein des Pilzes in einer Probe die beiden Impfungen durchaus nicht immer den Pilz ergaben. So entwickelte sich z. B. bei Nr. 13a (Tabelle I) der Pilz in 3 von 20 Kolben, und zwar in je einem Kolben der ersten, dritten und fünften Probe, bei Nr. 12b (Tabelle I) einmal in zwei Parallelkolben und sechsmal in nur je einem Kolben usw. Diese Erscheinung zeigte sich fast immer, wenn der Pilz nicht zu 100% vorhanden war, und zeigt jedenfalls, daß der Pilz, teilweise wenigstens, eine recht geringe Ausdehnung im Boden hat. Sie zeigt aber weiterhin, daß bei der gleich zu schildernden Impfung auch keine einheitliche Verseuchung der Probe mit Sporen vorhanden war, falls diese ausgebildet wurden. Weiter unten (S. 26) wird noch einmal auf diese Erscheinung zurückzukommen sein.

Die Proben, die meist ein Trockengewicht von 15 bis 30 g besaßen, kamen in kleine Papierbeutel, diese wiederum in größere Beutel, die mit einer Klammer verschlossen und möglichst bald seitlich hochkant gestellt wurden, damit sie schneller trockneten (vgl. die Bemerkung S. 15 zu den norwegischen Proben). Bei Laubwaldböden wurde mit einem an Ort und Stelle liegenden Hölzchen das grobe Laub und Reisig beiseite gebracht und dann die Probe mit diesem Hölzchen in die Beutelchen gescharrt. Bei Fichtenwaldböden wurde die Nadelstreu zum Teil mit der darunterliegenden Erde entnommen; hier würden weitere Untersuchungen natürlich noch eine Trennung vorzunehmen haben. Bei anderen oder festen Böden wurde die Probe mit einem Messer entnommen, das vorher dicht neben der Stelle der Probeentnahme ein paarmal durch Einstechen in den Boden gereinigt war. Bei Wiesenböden wurde dabei das Gras dicht an der Erdoberfläche abgeschnitten. Alle Proben stammten aus 1 bis 5 cm Tiefe.

Die Beimpfung der Kolben wurde so vorgenommen, daß aus dem vorsichtig geöffneten Beutelchen mit einem abgeflammten Löffelchen eine etwa dem Volumen eines kleinen Teelöffels entsprechende Menge Boden[1], und zwar nach Möglichkeit ganze Bodenbröckchen (um zu große Zerteilung mit möglicher Sporeninfektion zu verhindern) herausgenommen und in den Kolben mit der Nährlösung gebracht wurde, der selbstverständlich sofort wieder mit dem Wattepfropf verschlossen wurde. Diese Art der Beimpfung ist natürlich in quantitativer Hinsicht nur sehr grob. Ein Abwiegen empfahl sich aber nicht, einmal wegen der Infektionsgefahr, sodann aber vor allem deswegen, weil das Gewicht des Bodens einen schlechten Vergleich ergeben würde; einen besseren erlaubt das Volumen. Auf die geschilderte Weise war das besser zu erreichen, wenn, wie gesagt, vorerst auch nur ganz grob. Ein Ausschütteln des Bodens mit Wasser empfahl sich nicht, einmal deswegen, weil dabei gröbere Bodenteilchen, an denen der Pilz sitzen konnte, nicht in den Impfkolben gelangt wären. Sodann aber hätten Verdünnungen nach Art des Verdünnungsverfahrens einen Zeitaufwand erfordert, der bei den orientierend gedachten Untersuchungen und der Menge des untersuchten Materials nicht möglich gewesen wäre. Die nachfolgend zu schildernden Ergebnisse zeigen ja auch, daß die verwendete Methodik einen ersten Einblick gestattet. Auch hier müßten fernere Untersuchungen eine Verfeinerung der Methodik bringen.

Die Infektionsgefahr ist allerdings nicht so groß, wie man vermuten könnte. Es kommt vor allem Infektion aus der Luft durch die in unserem

[1] Das sind etwa 1 bis 2 g, je nach dem spezifischen Gewicht des Bodens. Eine absolute Genauigkeit im Abmessen war nicht zu erreichen, weil doch in vielen Fällen die natürliche Struktur des Bodens nicht erhalten war.

Institut zahlreich vorhandenen *Aspergillus*-Sporen in Frage. Es zeigte sich nämlich, daß in Kolben mit Tannin-Nährlösung, die tagelang offen standen, keine Entwicklung eintrat, offenbar weil vereinzelt hineingelangte Sporen sich nicht entwickelten. Außerdem tritt durch Verdunstung der Nährlösung im Brutzimmer bald eine Konzentrationserhöhung ein, die die Entwicklung weiter erschwert. Sie ist vielleicht auch mit der Grund dafür, daß sich kein anderer Pilz entwickelte. Tannin-Nährlösung, die bei Zimmertemperatur stand, ergab gelegentlich nach längerer Zeit Decken von anderen Pilzen. Jedenfalls ist die Gefahr einer Luftinfektion nur sehr gering. Die Kolben wurden dann, wie beschrieben, aufgestellt.

Die Beobachtungszeit betrug etwa 15 Tage. Länger andauernde Beobachtungen zeigten, daß dann die Entwicklung abgeschlossen war. Sehr verschieden ist nun das Bild der sich entwickelnden Decken. Vereinzelt kam es zu einer solchen überhaupt nicht, sondern das Mycel blieb schwammig-untergetaucht, was bei Abbruch des Versuchs durch vorsichtiges Ausgießen stets festgestellt werden mußte, da das erfolgte Wachstum sonst der Beobachtung entging. Abimpfungen von solchem Mycel zeigten, daß es sich in der Tat um *Aspergillus niger* handelte. Die Decken selbst sahen sehr verschieden aus. Im günstigsten Falle zeigte sich die normale Decke völlig mit Sporen besät, die teils tiefschwarz, teils dunkler oder heller braun, bisweilen auch schmutzig gelblich-bräunlich waren. In vielen anderen Fällen jedoch führte die Decke keine oder nur sehr wenig Sporen, die dann entweder zerstreut waren oder zu Inseln gehäuft standen. Die Decke selbst war dabei gekröseartig oder es entwickelte sich auch Luftmycel, das alles wattig überwucherte. In zwei Fällen kam es zur Ausbildung von Borsten oder Zotten auf dem Mycel; auch hier handelte es sich um *Aspergillus*, der mit *Mucorineen* verunreinigt war.

Wenn dabei *Aspergillus* nicht an u. U. vorhandenen Sporen zu erkennen war, wurde an zahlreichen Stichproben durch Abimpfung auf Würzeschrägagar festgestellt, daß es sich tatsächlich um diesen Pilz handelte. Allerdings waren es dann Mischkulturen; vornehmlich war *Aspergillus* dann von *Mucorineen* begleitet. *Rippel* und *Keseling* hatten früher schon gefunden, daß *Bacillus megaterium* sich zwar in Tannin-Nährlösung nicht entwickelt, aber auch nicht abgetötet wird, was also auch für Pilze gilt. Folgende Beobachtung zeigt das noch besonders deutlich: Von einer bei Abimpfung aus dem Versuchskolben auf Würzeschrägagar erhaltenen *Aspergillus-Rhizopus*-Mischkultur wurde wieder in Tannin-nährlösung zurückgeimpft, in der Erwartung, daß bei dieser Passage *Rhizopus* verschwinden würde. Das war jedoch nicht der Fall. Solche Begleitpilze (außer *Mucorineen* auch namentlich *Penicillium*-Arten; selbst Bakterien erscheinen hin und wieder auf dem *Aspergillus*-Mycel) kamen dann sekundär zur stärkeren Entwicklung, indem sie *Aspergillus* überwucherten. Auf einige dieser mit den geschilderten Erscheinungen zusammenhängenden Fragen wird später (S. 18f) noch zurückzukommen sein.

Von zahlreichen Kolben wurden Abimpfungen gemacht und der isolierte *Aspergillus*-Stamm auf Bildung von Sklerotien und auf andere Erscheinungen geprüft. Eine eingehende Untersuchung der auf diese Weise isolierten etwa 350 Stämme war natürlich nicht möglich. Auf einige dieser Fragen wird noch zurückzukommen sein.

Niemals entwickelten sich auf den Tannin-Nährlösungen andere Pilze allein, also ohne daß *Aspergillus* zugegen war, in einem Maße,

daß man von einer wirklichen Entwicklung sprechen konnte. Es kam allerdings vereinzelt vor, daß sich kleine Inselchen von *Penicillium* oder auch von *Aspergillus glaucus* bildeten; aber diese bleiben winzig und erreichten im besten Falle die Größe einer kleinen Erbse, woran vermutlich insbesondere die obenerwähnte Konzentrationserhöhung der Nährlösung Schuld gewesen sein dürfte. Sie entwickelten sich namentlich auf Blatt-, Nadel- oder Holzresten, die auf der Oberfläche der Nährlösung schwammen. Dagegen entwickelten sich, wie erwähnt, andere Pilze zusammen mit *Aspergillus* oder sekundär.

Regionale Standortsangaben.

Tabelle I zeigt zunächst das Ergebnis der an fünf bzw. zehn Einzelstellen je Örtlichkeit entnommenen Proben. Deren Anzahl ist jeweils in der dritten Spalte angegeben. Außerdem ist in der ersten Spalte hinter der Gebietsbezeichnung in Klammern angegeben, wer die Proben einsammelte. Für die liebenswürdige Unterstützung sei auch an dieser Stelle allen Herren bestens gedankt.

Ein Blick auf diese Zusammenstellung der Tabelle I zeigt nun, trotz mannigfacher Verschiedenheiten im einzelnen, daß die Häufigkeit des Pilzes offenbar von Norden nach Süden zunimmt, daß der Pilz an sich aber völlig bodenvag ist. Er fand sich, um zunächst diesen zweiten Punkt zu behandeln, in *allen Proben*, also zu 100 % nach der hier gehandhabten Darstellung, des alpinen Rasens auf dem Nebelhorn im Allgäu (Nr. 7a), des Krummholzes ebenda (Nr. 7c), der Talwiese am Fuße des Berges (Nr. 7g), ferner des Trockenrasens und des Weinberges des Kaiserstuhls bei Freiburg (Nr. 3a, 3c), der Sanddüne des Griesheimer Sandes bei Darmstadt (Nr. 1d), des Ackers der Garchinger Heide (Nr. 8c), des Fichtenwaldes von Neustadt im Schwarzwald (Nr. 5a; 95 %), des Heidelbeerbestandes des großen Arbers im bayrischen Wald unmittelbar unterhalb des Krummholzes (Nr. 9e), der anmoorigen Wiese im bayrischen Wald (Nr. 9b), um nur einige Gegensätze zu nennen. Alle weiteren derartigen Gegenüberstellungen können aus der Tabelle I abgelesen werden. Schon daraus geht hervor, daß offenbar die Konzentration der Wasserstoffionen nur eine sekundäre Rolle als Verbreitungsfaktor spielen kann. An Hand einiger p_H-Bestimmungen wird unten (S. 20) darauf noch einmal zurückzukommen sein.

Hierzu ist allerdings noch folgendes zu bemerken: Es wurde eingangs schon betont, daß die angewendete Methodik noch recht roh ist. 100 % brauchen in einem Falle nicht das gleiche zu bedeuten wie in einem anderen. Bei Verwendung kleinerer Impfmengen oder auch der Anlegung eines Untersuchungsnetzes hätten sich sicherlich noch Abstufungen ergeben. Doch handelt es sich hier erst um einen vorläufigen Einblick in unser Gebiet.

Tabelle I. Verbreitung von *Aspergillus niger*; fünf bis zehn Proben je Ort der Entnahme.

Lage und Charakterisierung des Standortes (Sammler)	Datum der Probenahme	Anzahl der Proben	*Aspergillus* vorhanden in % der Fälle
1. Griesheimer Sand bei Darmstadt *(Rippel)*.			
a) Acker dicht nördlich Bahnhof Griesheim	30. IX. 1937	5	90
b) Kiefernwald, alt; etwas Eichenbuschwerk; völlig vergrast. 2 km nördlich Bahnhof ..	30. IX. 1937	5	70
c) Eichenwald, alt, mit dichtem Buchenjungwuchs; kein Gras. 1 km westlich vorigem	30. IX. 1937	5	70
d) Kleine Sanddüne zwischen den beiden vorigen; vorwiegend *Helianthemum*; am Rande einige kleine Buschkiefern........	30. IX. 1937	5	100
2. Neustadt in der Pfalz *(Rippel)*.			
a) Kiefernwald auf Gipfel des Kalmit; Südhang dicht unter Gipfel. Außerdem wenige buschige Eichen und *Sorbius aria*; *Vaccinium Myrtillus*	1. X. 1937	5	80
b) Kiefernwald auf Gipfel des Kalmit; Nordhang dicht unter Gipfel. Mehr Eichen als bei vorigem; auch Buchen; *V. Myrtillus* .	1. X. 1937	5	80
c) Kiefernwald am Hang des Kalmit, etwa 100 m unter Gipfel; Nordhang. *V. Myrtillus*, ab und zu *Calluna*	1. X. 1937	5	80
d) Kiefernwald, etwa 150 m unter Gipfel des Kalmit; Südhang. Etwas buschige Eichen, *V. Myrtillus*	1. X. 1937	5	90
e) Buchenwald, etwa 300 m unter Gipfel des Kalmit; Osthang. Beginn der Buche, etwas vergrast	1. X. 1937	5	90
f) Eichen-Kiefernmischwald unmittelbar über Kastaniengrenze oberhalb Schöntal. Südhang	1. X. 1937	5	90
g) *Castanea vesca*-Wäldchen unmittelbar unterhalb Schöntal. Südosthang.........	1. X. 1937	5	100
h) Weinberg bei Neustadt, terrassierter Südhang des Wolfberges	1. X. 1937	5	100
3. Burkheim am Kaiserstuhl *(Rippel)*.			
a) Trockenrasen auf steilem Südhang gegen Rheinaue. Boden stellenweise nackt. *Aster linosyris*, *Alyssum montanum*, *Artemisia campestris*, *Dianthus carthusianorum*, *Linum tenuifolium*, *Teucrium chamaedrys*, *Stachys recta*, *Anthericum liliago*, *Allium*, *Eryngium* usw.	2. X. 1937	5	100
b) Rheinaue vor diesem Hang; sehr vergrast, buschig, viel Liguster	2. X. 1937	5	100
c) Weinberg bei Schloß; Südhang..........	2. X. 1937	5	90
d) Buchenwald auf Gipfel des Kaiserstuhls; Nordhang. *Asperula*, *Convallaria*	2. X. 1937	5	100
e) Eichenniederwald ebenda; Südhang. *Hedera*, *Vinca*, *Convallaria*, *Polygonatum*....	2. X. 1937	5	100

Tabelle I (Fortsetzung).

Lage und Charakterisierung des Standortes (Sammler)	Datum der Probenahme	Anzahl der Proben	*Aspergillus* vorhanden in % der Fälle
4. Feldberg-Schauinsland im Schwarzwald *(Rippel).*			
a) Subalpiner Rasen etwas unterhalb Feldberggipfel; Südhang. *Calluna, V. Vitis idaea, Meum*	3. X. 1937	5	100
b) Subalpiner Rasen von gleichem Ort; Nordhang	3. X. 1937	5	40
c) Fichten mit *V. Myrtillus* auf kleiner felsiger Kuppe nahe Baumgrenze unterhalb Feldberggipfel	3. X. 1937	5	90
d) Moor (kleines) zwischen Feldberg und Stübenwasen	3. X. 1937	5	10
e) Fichtenwald bei Stübenwasen, älter, viel *V. Myrtillus*; völlig vermoost	3. X. 1937	5	90
f) Fichtenwald, alt, zwischen Stübenwasen und Notschrei. Noch Buchen, *V. Myrtillus, Blechnum, Lycopodium*	3. X. 1937	5	80
g) Fichtenwald, alt; Abhang des Schauinsland	3. X. 1937	5	80
h) Weißtanne und Buche; Weißtannengrenze am Hang des Schauinsland; viel Farne	3. X. 1937	5	100
i) Weißtanne mit Buche, sehr dichter Bestand; mitten im Weißtannengebiet am Abhang des Schauinsland; Südhang	3. X. 1937	5	90
5. Neustadt im Schwarzwald *(Rippel).*			
a) Fichtenwald, älter, oberhalb Neustadt. Schwach nach Süd geneigt	4. X. 1937	10	95
b) Wiese vor diesem Fichtenwald. Am Rande *Meum*, sonst Kulturwiese	4. X. 1937	10	95
6. Schwäbische Alb bei Beuron *(Rippel).*			
a) Wiese unmittelbar oberhalb Irrendorf. Schwach nach Ost geneigt	5. X. 1937	5	100
b) Wiese unterhalb Irrendorf; Südhang. Felsig. *Dianthus carthusianorum, Anthyllis, Hippocrepis*	5. X. 1937	5	60
c) Wegrain auf rauhem Stein; eben. Sehr viel *Brunella grandiflora*	5. X. 1937	5	100
d) Fichtenwald, jünger, auf rauhem Stein. Boden nackt. Südostlage	5. X. 1937	5	90
e) Buchenwald in Mitte des Hanges gegenüber Beuron; Südosthang	5. X. 1937	5	90
f) Fichtenwald bei Bahnhof Beuron; Nordhang. Viel *Oxalis*	5. X. 1937	5	80
7. Oberstdorf im Allgäu *(Rippel).*			
a) Alpiner Rasen auf Nebelhorn, etwa 1950 m. Steiler Südhang, alpine Matte mit *Calluna, Vaccinium, Campanula, Rhododendron, Pinguicula.* 8 m unter Grat	6. X. 1937	5	100

Tabelle I (Fortsetzung).

Lage und Charakterisierung des Standortes (Sammler)	Datum der Probenahme	Anzahl der Proben	*Aspergillus* vorhanden in % der Fälle
b) Alpiner Rasen auf Nordseite des Grates, von voriger Stelle etwa 30 m Luftlinie entfernt. Flora etwas anders	6. X. 1937	5	90
c) Krummholz am Nebelhorn; Südsüdwestlage. *Salix, Dryas, Gentiana lutea, Rhododendron*	6. X. 1937	5	100
d) Fichtenbestand beim Beginn geschlossener Bestände bei Weg Nebelhorn-Vorder Seealp. Lockerer Bestand	6. X. 1937	5	100
e) Fichten, alt, ferner Buchen und Ahorn. Sehr viel *Erica carnea*, vergrast, etwas *V. Vitis idaea*. Steiler Südhang	6. X. 1937	5	100
f) Fichten- und Laubwald. *Erica* fehlt. Viel Moos. Kein Gras. Etwas *V. Myrtillus, Senecio Fuchsii, Prenanthes*. Sehr steiler Nordhang, durch Grat vom vorigen getrennt; nur etwa 15 m Luftlinie entfernt	6. X. 1937	5	90
g) Wiese an der Trettach, stark kultiviert, beweidet	6. X. 1937	10	100
8. Garchinger Heide bei München *(Rippel)*.			
a) Fichtenwald in Isaraue	7. X. 1937	5	100
b) Auwald der Isar, Ligusterunterholz	7. X. 1937	5	100
c) Acker	7. X. 1937	5	100
d) Heide, unberührt, ohne Kiefern	7. X. 1937	5	80
9. Bayrischer Wald *(Rippel)*.			
a) Fichtenwald bei Bodenmais, etwas Buche, viele *Abies*-Sämlinge. Schwacher Nordhang	9. X. 1937	5	90
b) Wiese zwischen Bodenmais und Zwiesel. Moorig, aber in Proben kein *Sphagnum*	9. X. 1937	5	100
c) Fichten am Arbersee, dicht bei Gasthaus. Buchen, junge *Abies*	9. X. 1937	5	50
d) Fichten, sehr alt, ziemlich oben am Arberhang; vermoost, Farne. Bei einer Probe *Sphagnum*	9. X. 1937	5	60
e) *V. Myrtillus*-Bestand unmittelbar unter Krummholz des Arbergipfels	9. X. 1937	5	100
f) Krummholz des Arbergipfels	9. X. 1937	5	70
g) Fichten-Buchenmischwald am Arbersee	9. X. 1937	5	80
h) Heide bei Zwiesel; Südlage. *V. Myrtillus, Vitis idaea, Calluna, Juniperus*, Birke	9. X. 1937	5	90
10. Thüringer Wald *(Rippel)*.			
a) Bergwiese bei Aussichtsturm Masserberg; schwach nach Süden. *Meum, Calluna, V. Myrtillus*	12. X. 1937	5	90
b) Bergwiese bei Neustadt; eben. Sehr wenig *Meum*	12. X. 1937	5	90
c) Bergwiese, eben, bei Masserberg	12. X. 1937	5	70
d) Fichten an Südosthang unterhalb Masserberg; Streudecke gering, kaum Graswuchs	12. X. 1937	5	100

Tabelle I (Fortsetzung).

Lage und Charakterisierung des Standortes (Sammler)	Datum der Probenahme	Anzahl der Proben	*Aspergillus* vorhanden in % der Fälle
e) Buchen, ebenda, unterhalb anschließend	12. X. 1937	5	60
f) Fichten auf Gipfel des Schneekopfes; Nordseite. Boden ziemlich nackt	12. X. 1937	5	90
g) Fichten am Rennstieg, schwach nach Süd. Sehr wenig vergrast	12. X. 1937	5	70
h) Fichten, alt, am Rennstieg; Moos, Gras, *V. Myrtillus*. Eben	12. X. 1937	5	30
i) Fichten, älter, am Rennstieg; Boden etwas vergrast	12. X. 1937	5	50
k) Buchen, Nähe von Masserberg am Rennstieg. Nordostlage	12. X. 1937	5	70
11. Birkenfeld a. d. Nahe *(Rippel).*			
a) Eichenniederwald (Lohhecke), dazwischen *Corylus* usw. *Centaurea montana, Digitalis lutea* usw. Mäßig steiler Südhang. Finsterkammer. *Anemone* blüht	12. X. 1937	10	85
b) Eichenniederwald, stärker vergrast und humoser als voriger. Nordhang gegenüber. Etwa 25 m Luftlinie. *Anemone* blüht noch nicht.....	12. X. 1937	10	90
c) Wiese in Igelshorn; ganz schwach nach Süden	12. X. 1937	10	65
12. Göttingen *(Rippel).*			
a) Eibenbestand und Buchen in Forst Bovenden; Südhang. *Vincetoxicum, Hepatica, Polygonatum, Convallaria, Lithospermum purpureo-coeruleum*	20. IX. 1937	10	55
b) Buchenwald und wenig Eiben. Nordhang an gleicher Stelle. Vorgenannte Flora fehlt	20. IX. 1937	10	40
c) Buchenwald im Göttinger Wald.........	13. IX. 1937	10	40
d) Fichtenwald an gleicher Stelle, etwa 100 m entfernt	13. IX. 1937	10	40
e) Buchenwald im Göttinger Wald zwischen vorigen und folgenden	6. VII. 1937	10	45
f) Hainbuchenwald auf Westerberg; Westhang	6. VII. 1937	10	85
g) Hainbuchenwald auf Spitze des Westerberges, meist Südhang. Ausgesprochen pontische Flora; *Lithospermum purpureo-coeruleum* usw..........................	6. VII. 1937	10	70
h) Acker unterhalb Rohns; schwach nach Westen	21. I. 1938	10	25
i) Wiese bei Hoffmannshof	21. I. 1938	10	15
k) Wald gegenüber Nikolausberg; Nordwesthang; typische Buchenwaldflora mit *Cephalanthera, Hepatica, Actaea* usw.....	21. I. 1938	10	25
l) Grashang im Luttertal; Süden. Etwas oberhalb: Standort von *Linum tenuifolium*	21. I. 1938	10	35
m) Grashang gegenüber im Tal; Norden....	21. I. 1938	10	15

Tabelle I (Fortsetzung).

Lage und Charakterisierung des Standortes (Sammler)	Datum der Probenahme	Anzahl der Proben	*Aspergillus* vorhanden in % der Fälle
13. Harz (*Rippel*).			
a) Buchenwald auf Höhe des Sachsensteins	7. VI. 1938	10	15
b) Gipsfelsenhang am Sachsenstein, steil nach Südsüdwest. Standort von *Gypsophila repens*	7. VI. 1938	10	45
c) Fichtenwald zwischen Braunlage und Elend. Ziemlich licht; stark vergrast. *Trientalis*	7. VI. 1938	10	5
d) Wiese bei Elend. *Meum athamanticum*	7. VI. 1938	10	5
e) Buchenwald oberhalb Wieda. Steil nach Südsüdwest. Vereinzelt Eiche, wenig *V. Myrtillus. Luzula albida*	7. VI. 1938	10	10
14. Magdeburger Börde (Herr Dr. *Nabel*).			
a) Acker (Rübenfeld) bei Biere	30. IX. 1937	5	50
b) Acker (abgeernteter Weizenacker) bei Biere	30. IX. 1937	5	50
15. Elbgebiet bei Schönebeck (Herr Dr. *Nabel*).			
a) Wiese im Überflutungsgelände	30. IX. 1937	5	50
b) Auenwald. Eiche, Ulme, Esche	30. IX. 1937	5	10
16. Fläming (Herr Dr. *Nabel*).			
a) Trockener Hügel bei Plötzky. Spärlicher Graswuchs, Flechten, steppenartig	29. IX. 1937	5	20
b) Kiefernwald, alt, bei Plötzky. Boden nackt	29. IX. 1937	5	50
c) Birken bei Plötzky auf Steinbruchschotter	29. IX. 1937	5	20
d) Acker (abgeerntete Kartoffeln) bei Plötzky	29. IX. 1937	5	10
17. Westpreußen (Herr *Görbing*).			
a) Wiese, stark humos-sandig bei Zamarte-Düsterbruch	9. XI. 1937	5	50
b) Acker, sandiger Lehm. Ebenda	9. XI. 1937	5	40
18. Lüneburger Heide (Herr Dr. *R. Meyer*).			
a) Heide, hoher Mechtlin bei Lübow (östliche Heide). Eben	15. IX. 1937	5	30
b) Heide, ebenda. Ziemlich geneigter Südhang	15. IX. 1937	5	30
c) Heide, Wilseder Berg (westlich Heide). Ebene Hochfläche	23. IX. 1937	5	20
d) Heide, ebenda. Südhang	23. IX. 1937	5	40
19. Friesland (Herr *Kluge*).			
a) Acker auf Flugsand, durch Plaggendüngung vom Menschen aufgetragen. Westrand der Geest. Schirumer Gegend bei Aurich	15.-25. X. 1937	5	30

Tabelle I (Fortsetzung).

Lage und Charakterisierung des Standortes (Sammler)	Datum der Probenahme	Anzahl der Proben	*Aspergillus* vorhanden in % der Fälle
b) Niederungsmoor, jetzt Wiesen. Riepsterhammrich bei Aurich	15.-25. X. 1937	5	30
c) Weide, abgetorftes Hochmoor-Flachmoor Dietrichsfeld bei Aurich	15.-25. X. 1937	5	40
d) Kiefernwald auf Heidesand bei Aurich	15.-25. X. 1937	5	20
e) Heidetorf-Rohhumus auf Dünensand bei Aurich	15.-25. X. 1937	5	60
f) Jungforst auf Dünensand (Eiche, Fichte, wenig Kiefer)	15.-25. X. 1937	5	50
g) Acker, durch Plaggendüngung über Ortstein aufgetragen. Erpelt bei Aurich	15.-25. X. 1937	5	50
h) Fichtenwald, alter, auf Heide-Rohhumus bei Aurich	15.-25. X. 1937	5	50
20. Ungarn (Herr Dr. *Manninger*).			
a) Acker, Komitat Tolna, Furged	III. 1938	5	100
b) Weide, ebenda	III. 1938	5	90

Daß der Pilz an sich bodenvag ist, geht noch aus folgenden Beobachtungen hervor: Ich habe ihn zwar nie im eigentlichen bewachsenen Hochmoor gefunden, aber an gleicher Stelle unmittelbar daneben, wenn z. B. kein *Sphagnum* mehr vorhanden war. So fehlte der Pilz in dem kleinen Moor beim Feldberg im Schwarzwald (Tabelle I, Nr. 4d) in den ersten vier Proben, die reinen *Sphagnum*-Bestand hatten, völlig, war aber 5 m von der vierten Probe, wo das Moor in wiesenähnlichen Bestand übergegangen war, in beiden Kolben dieser fünften Probe vorhanden. Bei den Fichten am Hang des großen Arbers (Tabelle I, Nr. 9d) fand sich der Pilz in allen Proben (wenn auch bei zwei Proben nur in je einem Kolben), fehlte aber beiden Kolben der zweiten Probe, die gerade aus einem *Sphagnum*-Polster entnommen war. Ferner fand ich den Pilz bei Birkenfeld (in Nr. 10 der Tabelle II enthalten) nicht in zwei geschlossenen Mooren, aber in den gleichen Mooren in der nackten Moorerde am Rande von Abzugsgräben. Auch in Salzerde bei Artern an der Unstrut (in Nr. 18 der Tabelle II enthalten) sowie in zwei *Salsola*-Pfannen Deutsch-Südwestafrikas (in Nr. 3 der Tabelle II enthalten) fand sich der Pilz. Als Kuriosum sei noch erwähnt, daß er sich auch in einem der beiden Kolben entwickelte, die mit einer Probe aus dem völlig sterilen (nicht in bakteriologischem Sinne!) Sand der Namib (in Nr. 3 der Tabelle II enthalten) geimpft waren.

Was nun die nach Norden hin abnehmende Häufigkeit betrifft, so sei hier vor allem auf folgende Gegenüberstellungen aus Tabelle I hingewiesen: Auenwald des Rheines am Kaiserstuhl (Nr. 3b) und an der Isar nördlich von München (Nr. 8b) in 100 %, der Auenwald an der

Elbe in der Gegend von Magdeburg (Nr. 15b) dagegen nur in 10 % der untersuchten Fälle. Der Fichtenwald im Harz (Nr. 13c) enthält den Pilz nur in 5 %, der Fichtenwald im Feldberggebiet (Schwarzwald) (Nr. 4c, 4e bis 4g) in 80 bis 100 %, vom bayrischen Wald (Nr. 9a, 9c, 9d) in 50 bis 90 %, vom Thüringer Wald (Nr. 10d, 10f bis 10i) in 30 bis 100 % der untersuchten Fälle. Die *Meum athamanticum*-Wiese von Neustadt im Schwarzwald (Nr. 5b) enthielt den Pilz in 95 %, die gleiche Wiese im Thüringer Wald (Nr. 10a bis 10c) in 70 bis 90 %, im Harz (Nr. 13d) nur in 5 % der untersuchten Fälle. Oder man vergleiche den Trockenrasen des Kaiserstuhls (Nr. 3a) sowie die Sanddüne von Griesheim bei Darmstadt (Nr. 1d) mit 100 % und den trockenenMuschelkalkhang bei Göttingen [1] (Nr. 12 l) sowie den trockenen Hügel im Fläming (Nr. 16a) mit 35 bzw. 20 %, ferner den Weinberg bei Neustadt (Nr. 2h) und am Kaiserstuhl (Nr. 3c), den Acker bei Griesheim (Nr. 1a) und auf der Garchinger Heide (Nr. 8c) mit fast stets 100 % mit den Äckern bei Göttingen (Nr. 12h), der Magdeburger Börde (Nr. 14a, 14b), dem Fläming (Nr. 16d), von Westpreußen (Nr. 17b) und von Friesland (Nr. 19a, 19g) mit Zahlen von 10 bis 50 % der untersuchten Fälle. Auf die niedrigen Zahlen im Harz (Nr. 13) sei auch noch besonders hingewiesen Endlich kann man feststellen, daß von Süden nach Norden die 100 %igen Zahlen immer weniger häufig werden, schließlich ganz verschwinden. Und im nördlichen Deutschland finden wir nur ganz vereinzelt noch Zahlen über 50 %. Auch ist unverkennbar, daß z. B. die Zahlen des Bayrischen und Thüringer Waldes (Nr. 9 und 10) eine Neigung zum Absinken zeigen gegenüber der Gegend um Neustadt in der Pfalz, dem Feldberg-Schauinsland-Gebiet im Schwarzwald und dem Nebelhorn-Gebiet im Allgäu (Nr. 2, 4, 7), wobei natürlich von dem Feldberg-Moor aus den oben S. 12 erwähnten Gründen abgesehen werden muß. Daß die Konzentration der Wasserstoffionen hierbei primär nicht entscheidend ist, wird noch gezeigt werden.

Auf einen Punkt muß hier noch hingewiesen werden, nämlich das Alter der Proben. Diese wurden nach Möglichkeit sofort untersucht. Da aber auf einer größeren Exkursion die Proben Nr. 1 bis Nr. 10 der Tabelle I in der angegebenen Reihenfolge eingesammelt und später auch in ungefähr dieser Reihenfolge untersucht wurden, so könnte man den Einwand machen, daß die in diesen Fällen beobachtete Abnahme nach Norden dadurch vorgetäuscht würde, daß in den zuletzt untersuchten Proben der Pilz bereits teilweise abgestorben gewesen war, da immerhin 2 Monate zwischen Ent-

[1] Wie Tabelle I zeigt, waren diese Proben im Januar nach vorausgegangener Frostperiode entnommen. Man könnte auf eine geringe Häufigkeit des Pilzes infolge des Winters schließen. Indessen zeigte eine am 19. August 1939 entnommene weitere Probe sogar eine noch geringere Häufigkeit, wobei allerdings die Unterlegenheit der Nordlage wiederum hervortrat (vgl. unten S. 17).

nahme und Impfung lagen. Aber dies trifft nicht zu: In Voraussicht dieses Einwandes wurden z. B. die Thüringer Proben (Nr. 10) vor denen der Garchinger Heide (Nr. 8) und der schwäbischen Alb (Nr. 6) untersucht. Außerdem wurden nach Beendigung der Untersuchung dieser Proben die zu Beginn untersuchten Proben von Nr. 2g und von Nr. 1a noch einmal untersucht, mit dem gleichen Ergebnis wie zu Beginn. Dagegen entwickelte sich der Pilz in Probe Nr. 4b bei Impfung 2 Jahre und 1 Monat nach der Probenahme nur mehr in 10% (gegen 40% vorher), war also offenbar teilweise abgestorben. Auch diese Erscheinung bedarf noch der näheren Untersuchung.

Tabelle II gibt eine Ergänzung hierzu; es handelt sich also um die zu nur je ein oder zwei für die jeweilige Örtlichkeit entnommenen

Tabelle II. Verbreitung von *Aspergillus niger*; ein bis zwei Proben je Ort der Entnahme.

Lage des Standortes (Sammler)	Datum der Entnahme	Anzahl der Proben	*Aspergillus* vorhanden in % der Fälle
1. Deutsch-Ostafrika (Herr *Plathe*)	1937	6	92
2. Südafrika (Herr *Görbing*)	1937	8	81
3. Deutsch-Südwestafrika	1937	22	85
4. Mittelamerika (Herr Prof. *Harder*)	Mai 1937	16	97
5. Dalmatien (Herr Dr. *Nabel*)	Juli 1937	6	100
6. Centralalpen (Herr Dr. *Nabel*)	Juli 1937	4	88
7. Ungarn (Herr Prof. *Fehér*)	Herbst 1937	11	100
8. Polen, ehemaliges (Südosten) (Herr Prof. *Firbas*)	Juli 1937	13	92
9. Tübingen (Herr Dr. *Uhl*)	August 1937	15	100
10. Birkenfeld a. d. Nahe (*Rippel*)	März, Juli 1937	78	58
11. Röhn (Herr Dr. *Nabel*)	April 1937	4	38
12. Kassel (Herr Dr. *Behr*)	April—Juni 1937	8	56
13. Werragebiet um Soden-Allendorf (Herr Dr. *R. Meyer*)	Februar - Mai 1937	19	29
14. Göttingen (*Rippel*)	März—Juli 1937	26	48
15. Weser und Solling (*Rippel*). Solling allein 5 Proben mit 10% Entwicklung	Mai 1937	10	40 *
16. Hils (Herr Forstmeister *Volger*)	Juni 1937	21	17
17. Harz (Herr Geheimrat *Behrens*)	Juni und November 1937	10	15
18. Kyffhäuser (Herr Dr. *Nabel*)	Mai 1937	7	50
19. Berlin (Herr Dr. *Bortels*)	Juni 1937	9	28
20. Pommern (Herr *Görbing*)	August 1937	11	18
21. Lüneburger Heide (Herr Dr. *Rud. Meyer*)	April—Oktober 1937	14	46
22. Dänemark und Jütland (Herr Dr. *Behr*)	September 1937	19	16
23. Norwegen, Gjövik (Herr Lehrer *Nyasen*)	Juli 1937	14	36
24. Breslau (Herr *Görbing*)	September 1937	c9	72
25. Karpathen (Herr Prof. *Firbas*)	Juli 1937	5	30

* Solling allein 5 Proben mit 10 % Entwicklung.

Proben. Wir finden also das gleiche Bild, so daß wir mit Sicherheit sagen können, daß die Süd-Nordabnahme des Pilzes eine Tatsache ist. Hier sei insbesondere auf die gleich niedrigen Zahlen (Tabelle II, Nr. 15 bis 17) von Solling (10 %; vgl. die Bemerkung unter Tabelle II), Hils (17 %) und Harz (15 %) hingewiesen. Auch hier ergibt sich alles Weitere aus der Tabelle. Auffällig könnten die verhältnismäßig hohen Zahlen von Norwegen mit 36 % (Nr. 23) erscheinen. Doch waren diese Proben feucht in Pergamentpapier eingewickelt und nachträglich verschimmelt, so daß eine sekundäre Vermehrung des Pilzes angenommen werden kann.

Es standen mir noch zahlreiche Proben von Spitzbergen (gesammelt von Herrn Prof. *Blanck*) zur Verfügung, bei denen aber in keinem Fall eine Entwicklung des Pilzes eintrat. Doch waren diese Proben bereits eine Reihe von Jahren alt, so daß dieser Befund nicht berücksichtigt werden kann. Ungefähr gleichaltrige Proben aus Chile (gesammelt von Herrn Prof. *Mortensen*) ergaben nämlich ebenfalls keine Entwicklung mehr, was sicherlich nur auf das Absterben des Pilzes zurückgeführt werden kann. Ferner trat in Proben aus Siam (überlassen von Herrn Prof. *Blanck*) nur in sehr wenigen Fällen eine Entwicklung ein, ebenso bei solchen aus Java (von Herrn Prof. *Hardon* freundlichst übersandt). In diesem Falle fehlte der Pilz in drei Proben, die vor längerer Zeit entnommen waren, völlig, während er bei drei anderen, frisch entnommenen Proben in allen geimpften Kolben vorhanden war. In den Tropen ist der Pilz also, wie man weiter aus Tabelle II, Nr. 1 bis 4, ersieht, fast 100 %ig vorhanden, ebenso in Dalmatien (Tabelle II, Nr. 5) und Ungarn (Tabelle II, Nr. 7); für Ungarn geht das auch aus Tabelle I, Nr. 20, hervor. Im Falle der Tabelle II, Nr. 7, handelt es sich um fünf Waldböden (unter elf Proben), in denen der Pilz also sehr häufig ist, worauf oben (S. 2) schon hingewiesen wurde.

Die größte Höhe, von der das Vorkommen des Pilzes untersucht und festgestellt wurde, war 2600 m: zwischen altem und neuem Hannoverhaus in den Zentralalpen, kahle Erde mit zerstreuten Polstern, etwa 15 m vom Schneefeld entfernt (unter Nr. 6 in Tabelle II enthalten). Er fand sich hier in den beiden Kolben, die aus der einen entnommenen Probe geimpft waren. Ob die Häufigkeit mit der Höhe geringer wird, kann hier nicht entschieden werden, da zur Entscheidung dieser Frage vieles berücksichtigt werden müßte (Bodenverhältnisse, Pflanzenformation, geringere Impfmenge usw.), was hier nicht geschehen konnte. Allerdings hatte ich anfänglich an diese Möglichkeit geglaubt und deshalb Proben im südlichen Deutschland von der Ebene bis zur alpinen Stufe gesammelt. Am ehesten könnte man aus der allmählichen Zunahme der Häufigkeitszahlen des Pilzes im Gebiet von Neustadt in der Pfalz (Tabelle I, Nr. 2) vom Gipfel des Kalmit (680 m Meereshöhe) herunter bis zur Stadt (142 m Meereshöhe) einen Einfluß der Höhenlage

erkennen wollen, welcher Schluß aber aus den angegebenen Gründen noch nicht möglich ist. Auf dem Nebelhorn im Allgäu (Tabelle I, Nr. 7a) fand sich der Pilz jedenfalls bei 1950 m Meereshöhe in 100% der Fälle.

Zum Schluß dieses Abschnittes seien noch die Zahlen der Tabellen I und II übersichtlich zusammengestellt. Es wurde dabei so verfahren, daß Gruppen der Häufigkeitszahlen gebildet wurden, indem in Tabelle I jede Örtlichkeit (also z. B. 1a, 3d usw.) jeweils der betreffenden Häufigkeitsgruppe zugewiesen wurde, und ebenso in Tabelle II jedes Gebiet (z. B. 1, 6 usw.). So ergab sich (Tabelle III):

Tabelle III.

	%ige Häufigkeit des Pilzes				Zahl der Örtlichkeiten
	100	95—70	65—50	unter 50	
Tabelle I.					
Südliches Deutschland (Nr. 1—8)	19	23	1	2	45
Mittleres Deutschland (Nr. 9—11)	3	12	5	1	21
Nördliches Deutschland (Nr. 12—19)	0	2	10	27	39
Tabelle II.					
Süden (Nr. 1—10, 24, 25)	3	7	1	1	12
Norden (Nr. 11—23)	0	0	2	11	13

Es geht daraus also einwandfrei hervor, wie schon an Hand der Einzelbeispiele gezeigt wurde, daß der Pilz von Norden nach Süden häufiger wird. Insbesondere ergibt sich das daraus, daß im Norden die Häufigkeit 100% ganz, die von 95 bis 70% fast ganz fehlt, während sich die geringere Häufigkeit (65 bis 50 und unter 50%) genau umgekehrt verhält. Die Zahlen sind so eindeutig, daß sie keiner weiteren Erläuterung bedürfen. Man findet sogar eine Andeutung dafür, daß das mittlere Deutschland in der Häufigkeit zwischen dem südlichen und nördlichen Deutschland steht, wenn hier auch größeres Material erwünscht wäre.

Man kann also in den an Hand der beiden Tabellen I bis III gemachten Feststellungen — zunächst nur im großen gesehen — eine Wirkung der Temperatur sehen, ebenso in folgender Beobachtung, wobei auf Weiteres noch zurückzukommen sein wird:

Besondere Standortsverhältnisse.

Es ist nämlich weiterhin von Interesse, daß der Pilz auf gleichem Standort *auf der Südlage häufiger ist als auf der Nordlage*, wie die nachfolgende Übersicht zeigt (Tabelle IV, die Bezeichnungen entsprechen denen der Tabelle I). Das ist besonders deutlich bei Nr. 4a

und 4b (Feldberg), Nr. 12l und 12m (Göttinger Muschelkalk) und Nr. 13b und 13a (Sachsenstein im Harz). In Tabelle IV ist noch die Entwicklungszeit angegeben, d. h. die Durchschnittszeit je Kolben, nach der die Entwicklung des Pilzes sichtbar wurde. Von der Gleichheit der Zahlen bei Nr. 4a und 4b und von den beiden Ausnahmen (Nr. 3d, 3e und 11a, 11b) abgesehen, auf die gleich zurückzukommen sein wird, zeigt sich einmal, daß der Pilz in der Südlage häufiger ist als in der Nordlage und daß andererseits in der Südlage die Entwicklungszeit kürzer ist, was nur mit einer kräftigeren Entwicklung des Pilzes im Boden erklärt werden kann und demgemäß ebenfalls als größere Häufigkeit zu werten ist. Diese Erscheinung zeigt sich z. B. auch bei Nr. 12g verglichen mit Nr. 12f (Göttinger Wald), obwohl hier die Häufigkeitszahl der Westlage größer zu sein scheint als die der Südlage, was nicht erklärt werden kann. Beide Stellen liegen indessen dicht beieinander auf dem vom Göttinger Wald vorspringenden Westerberg, der an der Stelle der Probe Nr. 12g, als typischen Vertreter einer wärmeliebenden Makroflora, einen Bestand von *Lithospermum purpureo-coeruleum* trägt; beide unterscheiden sich aber deutlich von denen des Bodens rückwärts inmitten des Göttinger Waldes (Nr. 12e). Es sei noch ausdrücklich erwähnt, daß die jeweilige Süd-Nordlage zu gleicher Zeit entnommen und untersucht wurde, so daß Temperaturschwankungen das Ergebnis nicht vortäuschen können.

Tabelle IV.

Nummer der Tabelle I	Lage	Vorkommen in % der Fälle	Entwicklungszeit	Nummer der Tabelle I	Lage	Vorkommen in % der Fälle	Entwicklungszeit
3d	Süd	100	7,0	12l	Süd	35	9,9
3e	Nord	100	4,9	12m	Nord	15	15,6
4a	Süd	100	5,3	12g	Süd	70	5,3
4b	Nord	40	5,0	12f	West	90	6,2
7a	Süd	100	4,1	12e	Eben	45	6,4
7b	Nord	90	5,1	13b	Süd	45	8,0
7e	Süd	100	3,0	13a	Eben	15	9,9
7f	Nord	90	4,0	18b	Süd	30	5,2
11a	Süd	85	7,9	18a	Eben	30	6,7
11b	Nord	90	6,7	18d	Süd	40	7,0
12a	Süd	55	6,6	18c	Eben	20	9,0
12b	Nord	40	8,5				

Worauf diese „kräftigere“ Entwicklung beruht, kann nicht gesagt werden, ob also die Mycelausbreitung größer ist, ob sie mit der Bildung von Sklerotien (S. 26ff.) zusammenhängt oder auch mit einer üppigeren Entwicklung von Sporen; der letztgenannte Fall wäre vielleicht bei

weiteren Untersuchungen durch das Verdünnungsverfahren zu klären oder auch durch mikroskopische Untersuchungen des Bodens, obwohl diese nicht ganz einfach sein dürfte.

Eine wesentliche Ausnahme bildet jedoch Nr. 3d, 3e (Gipfel des Kaiserstuhls), wo die Südlage eine deutlich langsamere Entwicklung zeigt als die Nordlage, bei gleicher, 100%iger, Häufigkeit. Die Erklärung ist hier aber höchst einfach: Die Nordlage führte nämlich viel Buchenlaub, das bei der Impfung auf der Nährlösung schwamm und auch später nicht untersank. So konnte sich der Pilz schneller auf der Oberfläche der Nährlösung entwickeln als bei der Südlage Nr. 3d, wo der Boden kaum Laub führte (lockerer Eichenwald), auf der Oberfläche der Nährlösung also keine Blattreste schwammen. Auf diese Weise wurde der Pilz bei Nr. 3a früher sichtbar.

Die zweite Ausnahme ist Nr. 11a und 11b (Birkenfeld), wo der Pilz in der Südlage weniger häufig ist und eine langsamere Entwicklung zeigt als in der Nordlage. Hier zeigte sich nun folgende Erscheinung: Von den 17 Kolben mit Pilzentwicklung der Südlage Nr. 11a zeigte keiner eine geschlossene Sporendecke, von den 18 der Nordlage Nr. 11b hatten 4 eine solche, von den 13 Kolben mit Pilzentwicklung bei Nr. 11c (Tabelle I, in Tabelle IV nicht mit aufgeführt) sogar 7. Wie oben schon erwähnt wurde, zeigt die Ausbildung einer geschlossenen Sporendecke einen reinen *Aspergillus*-Bestand an, so daß man hier auf der Südseite vielleicht irgendeine Störung durch andere Pilze annehmen kann, bedingt wohl durch Verschiedenheiten des Bodens bzw. des Pflanzenbestandes, die aus Tabelle I hervorgeht. Diese Probe Nr. 11a ist auch nach Tabelle V (S. 20) weniger sauer als Nr. 11b, was jedenfalls die andersartige Beschaffenheit anzeigt.

Derartige Beobachtungen wie die zuletzt geschilderte ergaben nun noch einige weitere Aufschlüsse über das Verhalten von *Aspergillus*. So zeigte sich beim Vergleich von Nr. 5a mit 5b (Tabelle I) bei den 5b-Kolben (Wiese) eine erheblich stärkere Entwicklung zur geschlossenen Sporendecke (16 von 19 Kolben mit Pilzentwicklung) gegenüber den 5a-Kolben (Fichtenwald; nur 6 von 19 Kolben mit geschlossener Sporendecke). Bei Nr. 1d (Tabelle I, Sanddüne) war eine geschlossene Sporendecke bei 10 von 10 Kolben mit Pilzentwicklung, also bei allen vorhanden, bei Nr. 1a bis 1c (Acker und Wald) nur bei 2 bis 3 von 7 bis 9 Kolben mit Pilzentwicklung, bei Nr. 3a bis 3c (Trockenrasen, Rheinaue, Weinberg) ebenfalls bei allen Kolben. während bei Nr. 3d und 3e (Wald) nur je 4 von 10 Kolben mit Pilzentwicklung eine solche aufwiesen. Ferner führten Nr. 7a und 7b (Tabelle I, alpiner Rasen) nur wenig Pilzdecken geschlossene Sporen, während bei Nr. 7g (Talwiese) alle 20 Kolben Decken mit dichtem Sporenbesatz aufwiesen. Endlich sei noch erwähnt, daß auch bei Nr. 8 (Tabelle I, Garchinger Heide) und

bei Nr. 20 (Tabelle I, Ungarn) ebenfalls alle Decken völlig mit Sporen bedeckt waren. Bei den Proben aus der Umgebung von Tübingen (Tabelle II, Nr. 9) war die Sporendecke bei Acker, Wiese, Steppenheide besonders ausgeprägt. Wie gesagt, ist die Ausbildung einer geschlossenen Sporendecke ein Zeichen für die Reinheit des *Aspergillus*-Bestandes [1], im anderen Falle finden sich daneben *Mucorineen* und andere Pilze in größerer Zahl.

Diese Beobachtungen, die durch zahlreiche weitere ergänzt werden könnten, zeigen, daß die Ausbildung geschlossener Sporendecken insbesondere für „offene" Formationen (Trockenrasen, Weinberg, Acker, Wiese u. ä.) charakteristisch ist, die Unreinheit der Kultur aber für Wald- und Rohhumusböden. Es wurde schon gesagt, daß hier die Konkurrenz anderer Pilze, namentlich von *Mucorineen*, eine entscheidende Rolle spielt. Man wird diese Konkurrenz, das bessere Gedeihen anderer Pilze, also auch als Erklärung für die Verbreitung von *Aspergillus* heranzuziehen haben. Hierbei kann neben der niedrigeren Temperatur, die sicherlich das Gedeihen anderer Pilze stärker fördert als das von *Aspergillus*, z. B. auch die Menge der organischen Substanz entscheidend sein. Man weiß ja (Literatur bei *Rippel*), daß *Mucorineen* namentlich die wasserlöslichen Stoffe von komplexem Pflanzenmaterial verzehren, sich also als erste Pilze in der Sukzessionsfolge darauf entwickeln. Weiterhin ist die Feuchtigkeit zu berücksichtigen. Die Untersuchungen von *Walter* und seiner Schülerin *Heintzeler* haben ja gezeigt, daß *Aspergillus*- (und *Penicillium*-)Arten xerophil sind, *Mucorineen* dagegen mesophil; und *Coleman* gibt für *Aspergillus* trocknere Nährböden als besonders geeignet an. In der Natur werden aber vielfach Temperatur und Feuchtigkeit in dem Sinne zusammenwirken, daß höherer Temperatur ein niedrigerer Feuchtigkeitsgrad entspricht. Auch das von *Killian* und *Fehér* beobachtete Vorherrschen der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* in der nordafrikanischen Wüste könnte mit ihren xerophilen Eigenschaften zusammenhängen.

Man darf also das Problem der *Aspergillus*-Verbreitung nicht als zu einfach ansehen. Und jedenfalls können orientierende Versuche, wie die geschilderten, die Frage noch keineswegs lösen, sondern nur den Weg zu eingehenderer Beobachtung aufzeigen, vor allem, wenn die Methodik, wie oben S. 2f bereits angedeutet wurde, wesentlich verbessert wird.

Hier muß nun noch erörtert werden, welche Bedeutung der *Konzentration der Wasserstoffionen* bei der Verbreitung von *Aspergillus niger*

---

[1] Es sei ausdrücklich hervorgehoben, daß die Bezeichnung „Reinheit" natürlich nur für die Ausbildung auf den Tannin-Nährlösungen gilt, nicht etwa für den Boden allgemein. In dieser Hinsicht wäre vielleicht von einer „relativen Reinheit" zu sprechen.

Tabelle V. Konzentration der Wasserstoffionen und Häufigkeit von *Aspergillus niger*.

Nr. der Tabelle I	p_H-Wert	ccm n/10 NaOH je 10 ccm	Häufigkeit %	Nr. der Tabelle I	p_H-Wert	ccm n/10 NaOH je 10 ccm	Häufigkeit %
2 d	3,5	0,30	90	5 b	4,8	0,05	95
10 d	3,6	0,95	100	9 b	5,7	0,05	100
5 a	3,7	0,30	95	16 a	5,8	0,05	20 N
4 c	3,7	0,95	90	11 c	5,9	0,05	65
4 b	3,9	0,85	40	3 d	6,1	0,05	100
13 c	3,9	0,55	5 N	11 a	6,1	0,05	85
4 a	4,0	0,80	100	13 b	6,1	0	45 N
13 e	4,0	0,50	10 N	3 e	6,2	0,05	100
2 b	4,2	0,15	80	17 b	6,2	0,05	40 N
9 e	4,2	0,40	100	19 a	6,2	0,05	30 N
15 b	4,2	0,30	10 N	13 a	6,3	0,05	15 N
9 h	4,3	0,30	90	1 d	6,6	0	100
10 a	4,3	0,20	90	8 b	6,7	0	100
13 d	4,3	0,25	5 N	7 g	6,7	0	100
11 b	4,4	0,25	90	14 a	6,7	0	50 N
16 c	4,4	0,15	20 N	3 a	$CaCO_3$*	0	100
7 a	4,7	0,05	100	12 l	$CaCO_3$*	0	35 N

Die hinter den Häufigkeitszahlen stehenden Buchstaben N bedeuten nördliches Deutschland.
* Carbonatboden, in der Tannin-Nährlösung aufbrausend.

zukommt. In Tabelle V sind einige Bestimmungen von p_H-Werten [1] (Ausschüttelung mit n KCl; Messung ausgeführt mit Lyphanstreifen) zusammengestellt, wobei solche Böden ausgesucht wurden, die sich einerseits in der *Aspergillus*-Häufigkeit stark unterschieden, andererseits solche, die extreme p_H-Werte erwarten ließen. Bei der Häufigkeitszahl in der vierten Spalte ist für die Proben aus dem nördlichen Deutsch-

Tabelle VI. Vergleich des Vorkommens von Aspergillus in gleichartigen Pflanzengenossenschaften.

Planzengenossenschaft	p_H-Wert	Häufigkeit	Planzengenossenschaft	p_H-Wert	Häufigkeit
Auenwälder			**Fichtenwald**		
Rheinaue (Nr. 3b)	6,7	100	Schwarzwald (Nr. 5a)	3,7	95
Isaraue (Nr. 8b)	$CaCO_3$	100	Thüringen (Nr. 10d)	3,6	100
Elbaue (Nr. 15b)	4,2	10	Harz (Nr. 13c)	3,9	5
***Meum*-Wiesen**			**Trockenrasen**		
Schwarzwald (Nr. 5b)	4,8	95	Kaiserstuhl (Nr. 3a)	$CaCO_3$	100
Thüringen (Nr. 10a) ..	4,3	90	Göttingen (Nr. 12b)..	$CaCO_3$	35
Harz (Nr. 13d)	4.3	5			

[1] Auch die Titrationsazidität ist angegeben. Sie geht nur teilweise den p_H-Werten parallel. Besondere Gesichtspunkte ergaben sich nicht daraus.

land ein N hinzugefügt. Es geht daraus eindeutig hervor, daß die Konzentration der Wasserstoffionen für die Verbreitung des Pilzes zum mindesten keine primäre Rolle spielt. Wenn man auch im Falle der drei Auenwälder (vgl. die vorstehende Tabelle VI) in der stark sauren Reaktion des Elbauenwaldes (p_H 4,2) die Ursache der geringen Häufigkeit von *Aspergillus* sehen wollte, so zeigt sich bei den drei *Meum*-Wiesen von gleichem p_H-Wert die gleiche Unterlegenheit der nördlichen Probe aus dem Harz, ebenso bei den drei Fichtenwäldern. Und umgekehrt zeigen die beiden Carbonatböden mit Trockenrasen ebenfalls die erhebliche Unterlegenheit der nördlichen Probe von Göttingen. Es sei dabei noch darauf aufmerksam gemacht, daß es sich bei Göttingen um einen Muschelkalkhang handelt, auf dem in etwa 200 m Entfernung der nördlichste Standort in Deutschland von *Linum tenuifolium* ist, also von einer mediterran-pontischen Pflanze, die ja auch im Trockenrasen des Kaiserstuhl vorkommt, dort allerdings in Gesellschaft mit zahlreichen weiteren Vertretern dieser Genossenschaft (vgl. Tabelle I, Nr. 3a).

Auch für die Reinheit des *Aspergillus*-Bestandes, von der oben gesprochen wurde, kann die Höhe der Konzentration der Wasserstoffionen allein nicht maßgebend sein: Denn die beiden Proben vom Gipfel des Kaiserstuhls (Nr. 3d und 3e) mit einem p_H-Wert von 6,1 bzw. 6,2 wiesen einen völlig unreinen, die Probe von der Schwarzwaldwiese bei Neustadt (Nr. 5b) mit einem p_H-Wert von 4,8 dagegen einen völlig reinen *Aspergillus*-Bestand auf. Hier sind also, wie oben S. 19 schon hervorgehoben wurde, noch andere Erklärungen heranzuziehen.

Die Betrachtung der p_H-Werte hat also gezeigt, daß *Aspergillus niger* sowohl auf sauersten wie auf $CaCO_3$-Böden maximale Häufigkeit erreichen kann. Daß er auf sauren Böden vorkommt, kann an sich nicht überraschen in Anbetracht der starken Säurebildung des Pilzes und seines niedrigen p_H-Optimums, das *Sakamura* bei p_H 2 angibt. Erstaunlicher ist demzufolge sein Vorkommen auf $CaCO_3$-Böden und vor allem die Tatsache, daß er auf weniger sauren, auch auf $CaCO_3$-Böden (vgl. z. B. den Trockenrasen des Kaiserstuhl. Nr. 3a der Tabelle I) gerade seinen reinsten Bestand zeigt. Das kann nicht übersehen werden, unbeschadet der oben gemachten Feststellung, daß für diesen Reinheitsgrad der p_H-Wert nicht unbedingt ausschlaggebend ist. Jedenfalls entzieht er sich hier, wie ausgeführt wurde, offenbar in erheblichem Maße der Konkurrenz anderer Mikroorganismen.

Auch dieser Pilz folgt also durchaus nicht der oft aufgestellten Regel, daß Pilze auf sauren Böden überwiegen. Wenn das auch im allgemeinen zutrifft (Literatur siehe bei *Rippel*), so bedeutet es eben keineswegs, daß bestimmte Pilze neutrale Reaktion etwa meiden; daß dies nicht der Fall ist, geht ja aus der zahlreichen Pilzliteratur zur Genüge

hervor. Es zeigt sich aber weiter, daß man mit der Übertragung einer in künstlicher Kultur festgestellten Eigenschaft auf die natürlichen Verhältnisse im Boden sehr vorsichtig sein muß. Man würde im Gegenteil annehmen können, daß der Pilz auf sauren Böden stärker zurücktritt. Denn wenn auch auf sauersten Böden des südlichen Deutschlands eine maximale Häufigkeit festgestellt wurde, so wurde oben S. 6 schon betont, daß eine verbesserte Methodik, etwa die Verwendung kleinerer Impfmengen usw., Abstufungen zeigen könnte. Die Unreinheit dieser Kulturen legt einen solchen Schluß fast nahe. Es kommt noch hinzu, daß auf sauren Böden im nördlichen Deutschland (vgl. z. B. den Harz, Nr. 13 der Tabellen I und V) eine besonders niedrige Häufigkeit festgestellt wurde. Wenn also auch der oben S. 20 gezogene Schluß bestehen bleibt, daß saure Reaktion keine *primäre* Ursache für das Zurücktreten von *Aspergillus niger* im Boden sei, so bleibt doch die Möglichkeit bestehen, daß sie *sekundär* einwirkt. Auch hierüber würden weitere Untersuchungen Aufschluß bringen können.

Schließlich ist noch auf eine bemerkenswerte Erscheinung einzugehen, nämlich die *Bildung von Sklerotien*, die bei *Aspergillus niger* selten beobachtet wurden (vgl. *Thom*). Es fiel auf, daß bei den zahlreichen von mir vorgenommenen Isolierungen auf Würze-Schrägagar häufig Sklerotien erschienen. Nur selten traten sie bereits auf den Decken in der flüssigen Tannin-Nährlösung auf, nämlich in einem Kolben von Nr. 5a (Tabelle I, Neustadt im Schwarzwald) und eigenartigerweise auf drei Kolben von Nr. 9 (Tabelle II, Tübingen). Beim Überimpfen auf Würze-Schrägagar traten dagegen Sklerotien sehr häufig auf, und zwar bei etwa $^1/_3$ der 350 vorgenommenen Isolierungen. Man kann die Bildung von Sklerotien bei *Aspergillus niger* also durchaus nicht als seltene Erscheinung bezeichnen. Die Sklerotien erschienen in den Röhrchen stets am Grunde, falls sie in geringer Zahl vorhanden waren; nur bei zahlreichem Vorhandensein drangen sie bis zur Mitte vor oder etwas darüber hinaus. Die Zahl war außerordentlich schwankend, von wenigen (2 bis 3) bis zu 2 bis 3 Dutzend. Sie erreichten im günstigsten Falle die Größe eines Hanfkorns.

Im allgemeinen war die Fähigkeit zur Bildung von Sklerotien bei den einzelnen Stämmen konstant, selbst nach Überimpfung aus etwas über 1 Jahr alten Kulturen auf Würze-Schrägagar, deren Inhalt natürlich längst völlig eingetrocknet war. Die obenerwähnten Stämme mit Sklerotien auf der Flüssigkeitskultur zeichneten sich übrigens auf Würze-Schrägagar keineswegs durch besonders starke Sklerotienbildung aus. Daß hin und wieder Schwankungen in der Stärke der Sklerotienbildung auftraten, kann nicht überraschen, wenn man die Wirkung von Außenbedingungen und auch die innerer Bedingungen bedenkt, von denen unten auf die Bedeutung der Temperatur etwas eingegangen werden

soll. Ob die Tannin-Passage, der meine Stämme vor der Isolierung ja unterworfen waren, eine Rolle spielte, kann nicht gesagt werden; jedenfalls aber beobachtete *Schwartz* einen günstigen Einfluß von Tannin auf die Bildung von Sklerotien bei unserem Pilz.

Ein besonders überraschendes Bild bot nun eine aus dunkler Erde von La Union (Salvador, unter Nr. 4 der Tabelle II) isolierter Stamm. Bei 30° C erschien nämlich auf den Würze-Schrägröhrchen ein weißes Mycel, das sich bereits nach 2 Tagen mit unzähligen Knötchen bedeckte, die nach weiteren 1 bis 2 Tagen sich als Sklerotien bis zur Größe eines Senfkorns erwiesen. Sporen wurden zuerst überhaupt nicht gebildet; erst nach einigen Tagen erschienen sie an der äußersten Spitze des Schrägröhrchens (also oben), auf welchen kleinen Raum sie auch späterhin beschränkt blieben. Bei Zimmertemperatur dagegen trat kein einziges Sklerotium auf; das Mycel war wie ein normaler Stamm völlig von schwarzen Sporen bedeckt. Es mag noch erwähnt werden, daß dieser tropische Sklerotienstamm in seinen mikroskopischen Merkmalen völlig den von *Thom* für *Aspergillus niger van Tieghem* gegebenen Maßen entsprach. Eine ganz ähnliche Erscheinung teilt *van Beyma thoe Kingma* für *Penicillium sclerotiorum* mit.

Ein derartiger Stamm wurde nun noch aus Bachsand von La Libertad (Salvador; unter Nr. 4 der Tabelle II), aus einer anderen dunklen Erde von La Union (Salvador, unter Nr. 4, Tabelle II) und aus einem dunkelbraunen Boden von Siam (in den Tabellen nicht erwähnt, da nur wenige Proben Entwicklung ergaben; vgl. S. 15) isoliert. Bei keinem der europäischen Stämme wurde ein gleiches beobachtet. Hier konnte auch nicht festgestellt werden, ob die Häufigkeit der Sklerotien etwa nach Gegenden verschieden sei. Stämme mit guter Sklerotienbildung wurden sowohl aus dem Mittelmeergebiet wie auch aus dänischen bzw. jütländischen und aus norwegischen Böden isoliert. Ein Fall muß hierbei noch erwähnt werden: Aus dunkler Erde von der Boma Ilimbi, Deutsch-Ostafrika (unter Nr. 1, Tabelle II), wurde ein Stamm isoliert, der deutlich eine Mittelstellung einnahm: erheblich mehr Sklerotien als bei den europäischen Stämmen, aber keine geschlossene Sklerotiendecke wie bei dem obenerwähnten. Die Ausbildung solcher geschlossener Sklerotiendecken muß demnach als eine Eigenschaft gewisser tropischer Stämme angesprochen werden, wobei sich alle Übergänge finden. Es ist dabei zu beachten, daß die Isolierungen europäischer Stämme unverhältnismäßig zahlreicher (fast zehnmal so groß) waren als die tropischer, die Wahrscheinlichkeit des Auffindens also erheblich größer war.

In tropischen Böden (Mittel-Amerika, Java, Siam, Deutsch-Ostafrika) waren die starken Sklerotienbildner in großer Minderheit, nämlich 5 von 35 Isolierungen (einschließlich der ostafrikanischen

Übergangsform). Zehn aus Böden von Deutsch-Südwestafrika (unter Nr. 3, Tabelle II) gezogene Stämme ergaben neun reine Sporenbildner und einen Stamm mit sehr geringer Sklerotienbildung. Im übrigen fanden sich in den tropischen Böden durchaus nicht mehr schwache Sklerotienbildner als in den europäischen, es überwogen sogar stark die reinen Sporenbildner. Leider sind die vorliegenden Versuche nicht zahlreich genug, um Endgültiges darüber auszusagen.

Wenn die starken tropischen Sklerotienbildner bei niederer Temperatur keine Sklerotien bilden, so könnte man vermuten, daß eine Mischkultur vorläge und bei niederer Temperatur ein Sporenstamm die Oberhand gewänne. Indessen zeigten sieben von dem oben zuerst erwähnten Sklerotienstamm von La Union gezogene Einsporkulturen alle das gleiche Bild, wie es geschildert wurde. Im übrigen können aus einem Kolben verschiedene Stämme isoliert werden. So fand sich in dem gleichen Kolben, aus dem der eben erwähnte Stamm gezogen wurde, ein anderer, der bei 30° C Sporen bildete wie die europäischen Stämme und dazu unten im Röhrchen wenig Sklerotien aufwies wie die Sklerotienbildner unter diesen. Aus dem gleichen Kolben, aus dem der obenerwähnte starke Sklerotienbildner von La Libertad gezogen wurde, wurde ein anderer Stamm isoliert, der nur Sporen führte, niemals Sklerotien. Ferner wurde aus europäischen Böden mehrfach aus dem gleichen Kolben ein Stamm mit und ein solcher ohne Sklerotienbildung isoliert. Es kann hier natürlich nicht entschieden werden, ob die verschiedenen Stämme eines Kolbens von gleichem Mycel im Boden herstammen.

Abgesehen von dieser Sklerotienbildung wurden auch in *sonstigen Eigenschaften verschiedenartige Stämme* isoliert: So fanden sich Stämme mit mehr oder weniger gelb gefärbtem Mycel, ferner solche mit mehr oder weniger faltigen Decken. In dieser letzten Hinsicht ist z. B. bemerkenswert, daß aus den Tübinger Proben (Nr. 9, Tabelle II) Stämme isoliert wurden, deren Decke äußerst dünnfaltig war; die Sporen überzogen, als ob sie abgeschleudert wären, die Glaswand des Würzeagar-Röhrchens mit einem dunklen Schleier. Ein gleiches Bild zeigten die aus Java (in den Tabellen nicht aufgeführt, da nur einige Proben zur Entwicklung gelangten; vgl. S. 15) isolierten Stämme, während das Mycel sonst im allgemeinen grobfaltig war, und die Sporen an der Decke festhafteten. Natürlich ist es nicht unbedingt sicher, ob es sich tatsächlich in allen Fällen um den eigentlichen *Aspergillus niger van Tieghem* handelt, obwohl nach dem äußeren Bild nicht daran zu zweifeln ist und jedenfalls der erwähnte tropische starke Sklerotienbildner, dessen nähere Beschreibung übrigens von anderer Seite erfolgen wird, sich als zur engsten Art zugehörig erwies, wie oben S. 23 schon gesagt wurde. Jedenfalls trat bei allen 350 Isolierungen niemals ein Bild auf, das nicht in die Erscheinungsform des normalen *Aspergillus niger* gehören würde.

Zweifellos aber wäre es ein ökologisch äußerst interessantes Problem, wenn nachgewiesen werden könnte, ob solche Unterschiede (wozu natürlich noch rein physiologische, wie Form der Säurebildung usw. kommen würden) irgendwie ökologisch bedingt seien, eine Frage, die hier natürlich nicht gelöst werden konnte. Ob die vereinzelte Angabe von *Scaramella* zutrifft, wonach alpine Stämme von *Aspergillus niger* und *Rhizopus nigricans* einen schnelleren Stoffwechsel besitzen als solche aus der Ebene, wäre an ausgedehnterem Material nachzuprüfen. Ebenso wäre zu prüfen, ob südlichere Stämme ein höheres Temperaturoptimum besitzen [vgl. die weiter unten (S. 26) folgenden Ausführungen].

Nun wäre noch ein Wort über die Abhängigkeit der Sklerotienbildung von der Temperatur zu sagen. Die schwachen Sklerotienbildner bildeten bei etwa 20° C keine Sklerotien aus, auch nicht nach Wochen, so daß es sich nicht etwa nur um eine Verzögerung handeln kann. Auch die fünf tropischen starken Sklerotienbildner zeigten dann im allgemeinen keine Sklerotien. Diesen zahlreichen Versuchen steht allerdings einer gegenüber, in dem auch bei dieser Temperatur drei von den fünf Sklerotien ausbildeten; doch handelt es sich offensichtlich um eine Ausnahme, die das allgemeine Bild nicht berührt. Bei 30° C war überall die Sklerotienbildung gut, d. h. in dem für den jeweiligen Stamm charakterisitischen Umfange und soweit die Stämme überhaupt Sklerotien bildeten, was auch bei dieser Temperatur bei den reinen Sporenstämmen niemals eintrat. 37° C brachten in fast allen Fällen, am ausgeprägtesten bei den starken tropischen Sklerotienbildnern, wieder einen Rückgang in der Ausbildung der Sklerotien. Auch *Schwartz* gibt für *Aspergillus niger* und *van Beyma thoe Kingma* für *Penicillium sclerotiorum* die für die Sklerotienbildung günstige Wirkung höherer Temperatur an.

Daraus geht jedenfalls hervor, daß eine optimale Temperatur der Sklerotienbildung besteht, und zwar bei einer Höhe der Temperatur, wie sie auch in gemäßigten Breiten erreicht werden kann. Der Pilz hat ja im Vergleich zur höheren Pflanze eine sehr kurze Entwicklungszeit, so daß gegebenenfalls wenige Tage über den Gang der Entwicklung entscheiden können. Auch die Lösung dieser Frage würde von ökologischen Gesichtspunkten aus wertvolle Aufschlüsse versprechen, wenn es gelänge, nachzuweisen, ob sich auch in der Natur eine Bildung von Sklerotien vollzieht[1], ob diese als Dauerorgane in Frage kommen oder vielleicht sogar gelegentlich zur sexuellen Fruktifikation schreiten, wie sie bisher bei *Aspergillus niger* allerdings noch nicht beobachtet

---

[1] Bezüglich einiger Literaturangaben über den Einfluß der Jahreszeit auf die Bildung von Sklerotien und Perithecien, die noch recht problematisch erscheinen (vgl. *Schwartz*, S. 391).

wurde (vgl. *Thom* und *Church*, S. 170), wie sich demgegenüber die Sporenbildung verhält usw.

Wenn oben S. 4 festgestellt wurde, daß der Pilz im Boden teilweise wenigstens eine geringe Ausbreitung besitzt, so würde hier die Frage auftauchen, ob er nicht unter Umständen gleich zur Bildung von Sklerotien als Dauerorganen schreitet. Die Tatsache, daß Sklerotien bei den von mir isolierten Stämmen recht häufig waren, würde, in Verbindung mit der von *Schwartz* mitgeteilten Steigerung der Fähigkeit zur Sklerotienbildung durch Abimpfen von sklerotienbildenden Teilen, die Vermutung nahelegen, daß diese Gebilde in der Natur eine gewisse Rolle spielen. Weiterhin wurde oben S. 17 schon erwähnt, daß sich z. B. Nord- und Südlagen nicht nur in der Häufigkeit des Pilzes, sondern auch in der Schnelligkeit seiner Entwicklung unterscheiden. Ein gleiches scheint der Fall zu sein beim Vergleich südlicher und nördlicher Länder; z. B. war die Entwicklungszeit der mittelamerikanischen Proben (Nr. 4, Tabelle II) 3,3 Tage gegen 6,3 Tage bei den Göttinger Proben (Nr. 14, Tabelle II)[1]. Das könnte mit einer Wirkung der Temperatur auf den Gang der Entwicklung zusammenhängen, wobei aber ungewiß bleibt, ob es sich um vermehrte Mycel-, Sklerotien- oder Sporenentwicklung handelt. Auch wäre mit der Möglichkeit zu rechnen, daß die südlicheren Stämme ein höheres Wärmeoptimum besitzen als die nördlicheren, das ihnen während der in der Kultur herrschenden Temperatur eine schnellere Entwicklung ermöglichte. Leider fehlen gerade auf diesem Gebiete noch fast jegliche Grundlagen. Es ist aber nicht daran zu zweifeln, daß eingehendere Untersuchungen im Freien in Verbindung mit Laboratoriumsversuchen über die Entwicklungsphysiologie des Pilzes, wie sie etwa von *Schwartz* begonnen wurden, wertvolle Aufschlüsse bringen könnten.

Einige allgemeine Betrachtungen.

Es scheint allerdings fast zweifelhaft, ob sich *alle* Fragen der Verbreitung unseres Pilzes durch die ökologische Bedingtheit werden lösen lassen. Wenn selbst aus norwegischen Böden sklerotienbildende Stämme isoliert werden konnten, so deutet das, in Anbetracht der nur bei höherer Temperatur stattfindenden Sklerotienbildung (während niedrigere Temperatur noch üppige Sporenbildung zuläßt, ohne daß Sklerotien gebildet werden) doch darauf hin, daß der Pilz sich bis zu einem gewissen

[1] Auf diese Verhältnisse sei hier nicht näher eingegangen, da die zu verschiedenen Zeiten vorgenommene Kultivierung bei der nicht völligen Gleichmäßigkeit der Temperatur keine unbedingte Sicherheit gewährt. An und für sich kann aber an der geschilderten Erscheinung in qualitativer Hinsicht nicht gezweifelt werden.

Grade auch in Norwegen wohl fühlt und dort auch in der Natur wahrscheinlich Sklerotien bildet, wie die oben S. 26 gemachten Ausführungen vermuten lassen; ein gleiches gilt für das nördliche Deutschland. Warum ist er hier aber nicht so häufig wie im südlichen? Es hält schwer, die Temperatur allein dafür verantwortlich zu machen. Denn man wird kaum annehmen können, daß diese etwa im Fichtenwald des Schwarzwaldes höher liegt als an den sonnigen Kalkhängen Göttingens. Diese Überlegung zeigt aber weiterhin, was schon genügend hervorgehoben wurde, daß man auch nicht zunehmende Versäuerung der Böden des nördlichen Deutschlands primär oder sekundär über die Konkurrenz durch andere Pilze für den Rückgang von *Aspergillus* verantwortlich machen kann, in Anbetracht des häufigen Vorkommens in den alpinen und subalpinen Rohhumusböden des südlichen Deutschlands. Man kann sich des Eindrucks nicht erwehren, daß hier noch ganz andere Gründe vorliegen müssen als die bereits besprochenen. Für das südliche Deutschland könnte man annehmen, daß die Rohhumusböden dort in nicht zu weiter Entfernung von *Infektionsgebieten* umgeben sind, von wo aus sie leicht besiedelt werden können. Will man aber mit dieser Möglichkeit rechnen, so liegt der weitere Schluß nahe, daß *Aspergillus niger* von Süden her auch die nördlich gelegenen Gegenden infiziert, d. h. aber, daß er in nacheiszeitlichem Vordringen gegen Norden sei. Auch von diesem Gesichtspunkt aus wäre es sehr erwünscht, wenn weitere Kenntnis von der Verbreitung dieses Pilzes, namentlich auch in den nordischen Ländern gewonnen werden könnte. Die mir zur Verfügung stehenden Proben aus Spitzbergen waren leider, wie oben S. 15 erwähnt wurde nicht mehr brauchbar, und auch das Ergebnis der norwegischen Proben war mit einer Unsicherheit behaftet (S. 15).

Es sei nun eine Zusammenstellung der mir aus der Literatur bekannt gewordenen Fundorte von *Aspergillus niger* gegeben.

Van Tieghem gibt für sein Vorkommen an: Tannin-, Zucker- usw. Lösungen, sauren Urin, feuchtes Brot, in Zersetzung begriffene Blätter. *Boedijn* isolierte ihn von Gambir, *Fischer* aus erkrankten Bienenmaden. Nach *Wilson* und *Daub* bildet er Flecken auf Leder. Er wurde weiterhin vielfach auf lebenden und toten Pflanzenteilen festgestellt, ferner als Tier- und Menschenparasit. Diese Angaben seien hier nicht im einzelnen angeführt; ich verweise auf die Bibliographie von *Tamija* sowie auf *Thom* und *Church*.

Es folgen nun Angaben über das Vorkommen in Boden: Abgesehen von dem schon S. 2 erwähnten negativen Ergebnis von *Fehér* konnten z. B. auch folgende Autoren *Aspergillus niger* nicht feststellen; wobei allerdings nicht eigens auf diesen Pilz gefahndet wurde, ebensowenig natürlich bei den später folgenden positiven Angaben: *Adametz* (2 Leipziger Ackerböden), *Dixon* (australische Böden), *Goddard* (Ackerboden Englands), *C. N. Jensen* (15 USA.-Böden des Ostens), *Kubiena* (4 deutsche Böden Österreichs), *Niethammer* [(1) 17 böhmische Böden], *Oudemans* usw. (Wald-

boden Hollands), *v. Szilvinyi* (Toba-Heide auf Sumatra), *Verona* (Moorboden der Poebene). Das Fehlen ist aber teilweise sicherlich auf die oben S. 2 geschilderte Unvollkommenheit der Methodik zurückzuführen.

Als selten erwies sich *Aspergillus niger* bei: *H. L. Jensen* (unter 100 dänischen Böden nur im Gewächshaus), *Le Clerc* (in 1 von 27 USA.-Coloradoböden), *Raillo* (1 von 3 russischen Böden: er fand sich hier merkwürdigerweise nur in der nördlichsten Probe, unweit Murmansk) und *Traan* (in 1 unter 70 norwegischen Böden). Auch diese Angaben dürften das Vorkommen als zu gering erscheinen lassen. Unter den nordischen *Aspergillus*-Arten führt *Sopp* auch *niger* auf.

Etwas häufiger erschien der Pilz bei: *Dale* (in 1 von 5 englischen Böden), *Janke* usw. (in 2 von 5 deutschen Böden Österreichs), *Negroni* (in 5 von 25 Böden der Umgebung von Buenos Aires), *Stapp* und *Bortels* (in Waldstreu aus verschiedenen Gegenden von Deutschland; seltener als *Penicillium*), *Waksman* 1 (in 3 von 8 USA.-Böden) und *Waksman* 2 (in 9 von 25 USA.-Böden, einschließlich Porto Rico).

Endlich fanden ihn vorherrschend *Chaudhuri* und *Sacchar* (in den 4 untersuchten indischen Böden), *Gischitzkaja* (russische Waldböden), *Subet* (in 11 von 12 untersuchten ägyptischen Böden als zweithäufigsten Pilz) und *Werkenthin* (häufigster Pilz in Texasböden). Auch gehört der Pilz nach *Killian* und *Fehér* zu den in Wüstenböden (Sahara) vorherrschenden Arten, wie dort überhaupt die Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* vorherrschend sind.

Einzelne Angaben über das Vorkommen finden sich bei *Abbot* (USA.-Jowa- und Louisianaböden), *Koch* und *Oelsner* (verschiedene Böden um Göttingen), *Niethammer* [(2) Italien, Jugoslavien], *Rathbun* (USA.-Rhode-Islandböden), *Scaramella* (Kleiner St. Bernhard in 2314 m Höhe), *Takahashi* (Japan) und *Verona* (Italien).

Man kann in diesen wenigen Angaben eine Bestätigung des hier gemachten Befundes sehen, daß *Aspergillus niger* nach Süden häufiger wird. Verschiedene Autoren heben auch das aus der künstlichen Kultur bekannte größere Wärmebedürfnis der *Aspergillus*-Arten, auch von *niger*, zur Erklärung der Verbreitung hervor (*H. L. Jensen, Niethammer, Stapp* und *Bortels, Werkenthin*). Indessen dürfte *Aspergillus niger* nach den vorliegenden Untersuchungen auch in kälter gemäßigten Breiten häufiger sein als das nach den erwähnten Angaben anzunehmen war, wenn er auch verhältnismäßig stärker zurücktreten dürfte als in wärmeren Breiten. Sicherlich kommt er z. B. in dänischen Böden nicht nur in Gewächshäusern vor, wie *H. L. Jensen* fand, worüber man Nr. 22 der Tabelle II in vorliegender Abhandlung vergleichen möge.

Es liegt natürlich nahe, auch in der geschilderten Verbreitung des Pilzes die Temperatur als die unmittelbare Ursache zu sehen, zumal der Pilz in den vorliegenden Untersuchungen in Südlagen auch häufiger festgestellt wurde als in Nordlagen. Indessen wird die Temperatur wohl nur der *Grundfaktor* der Verbreitung sein, der zunächst die regionale Verbreitung bestimmt. Ähnlich nun, wie sich bei den höheren Pflanzen die wärmeliebenden Formen teilweise nach Norden vortasten, scheint sich *Aspergillus niger* zu verhalten. Natürlich liegen dabei die Ver-

hältnisse für einen Pilz wesentlich günstiger. Eine typische Tropenpflanze wird niemals ihr Gedeihen in nördlich gemäßigten Breiten finden. Die kurze Entwicklungszeit gestattet einem Pilz jedoch zweifellos eine weitaus größere regionale Lebensspanne.

Wenn also niedere Pflanzen im Vergleich zu höheren Pflanzen in weitaus stärkerem Maße als Kosmopoliten erscheinen, so dürfte das durchaus verständlich sein, zumal weiterhin auch die Verbreitungsmöglichkeit für jene günstiger sein dürfte als für diese. Aber es ist dabei die quantitative Seite zu beachten, daß also eine wärmeliebende Form doch eine quantitative Abnahme gegen Norden ergeben könnte, wie es nach den vorliegenden Untersuchungen bei *Aspergillus niger* der Fall ist. Man wird also bei niederen Pflanzen keine so strengen Vegetationsgrenzen erwarten dürfen wie bei vielen höheren, sondern bei wärmeliebenden Formen mehr ein quantitatives Abklingen nach Norden, das natürlich bei den einzelnen Formen verschieden stark sein kann, wobei es natürlich schließlich doch noch zu einem völligen Fehlen kommen kann, was im vorliegenden Falle noch nicht entschieden werden konnte. Auch erscheint es natürlich durchaus möglich, daß gewisse wärmeliebenden Formen nicht mehr in die kälter gemäßigten Breiten vordringen. Umgekehrt aber wird sich für Mikroorganismen auch die Verbreitungsspanne nach den Tropen zu weiter ausdehnen können als bei den meisten höheren Pflanzen, namentlich wenn man die quantitativen Verhältnisse berücksichtigt. Auch hierfür dürfte, nach den vorliegenden Untersuchungen, *Aspergillus niger* ein Beispiel sein. Für andere Mikroorganismen sind solche quantitativen Untersuchungen noch nicht durchgeführt; sie würden aber für die Frage nach der Bewertung kosmopolitischer Formen der Mikroorganismen zweifellos neue Gesichtspunkte ergeben.

Wie die aus wärmeren Gegenden stammende höhere Pflanze etwa in Deutschland an besonders warme, sonnige Standorte gebunden ist, so scheint es auch mit *Aspergillus niger* der Fall zu sein. Die größere Häufigkeit auf Südhängen zeigt dies. Im Göttinger Wald (Nr. 12a bis g der Tabelle I) hebt sich der sonnige Standort a, f, g, gekennzeichnet durch *Lithospermum purpureo-coeruleum*, aus der Umgebung durch größere *Aspergillus*-Häufigkeit hervor. Ein gleiches ist bei dem sonnigen Kalkhang des Luttertales (Nr. 121 der Tabelle I) gegenüber der Umgebung (Nr. h, i, k, m ebenda) der Fall, gekennzeichnet durch das Vorkommen von *Linum tenuifolium*. Endlich zeigt der sonnige Hang des Sachsensteines im Harz (Nr. 13b der Tabelle I), gekennzeichnet durch *Gypsophila repens*, die gleiche Erscheinung der Umgebung gegenüber (Nr. 13a ebenda). Es kann keinem Zweifel unterliegen, daß weitere Untersuchungen weitere Bestätigungen erbringen würden. Es wäre aber, nach den oben gemachten Ausführungen, natürlich verfehlt,

Aspergillus niger etwa als eine mediterran-pontische Form analog den genannten höheren Pflanzen zu bezeichnen. Hier sprengt eben die Verbreitungsspanne der Mikroorganismen die für höhere Pflanzen teilweise gültige Grenze.

Der Vergleich mit höheren Pflanzen kann aber noch weiter geführt werden: Man nimmt etwa für die „pontischen" Formen an, daß sie an ihrem Standort deshalb gedeihen, weil sie dort nicht der Konkurrenz durch andere Arten unterliegen, die sie anderwärts unterdrücken würden. Die vorliegenden Untersuchungen führten für *Aspergillus niger* zu dem gleichen Schluß, wobei es unbestimmt bleibt, ob die durch andere Pilze, wie namentlich auch *Mucorineen*, ausgeübte Konkurrenz auf Acidität, reichliches Vorhandensein organischer Stoffe, niedrigere Temperatur, höhere Feuchtigkeit oder noch andere Ursachen zurückzuführen ist. Daß dabei, wie oben erwähnt wurde, der Schluß auf eine nacheiszeitliche Einwanderung des Pilzes innerhalb Deutschlands nach Norden naheliegt, rundet das geschilderte Bild ab.

In ihrer Gesamtheit zeigen die vorliegenden Untersuchungen, daß auch bei Beschränkung auf ein Objekt eingehendere, quantitative Untersuchungen an Mikroorganismen, soweit sie durchführbar sind, wertvolle Einblicke in die Verbreitungsbedingungen der Mikroorganismen erwarten lassen. Darüber hinaus ergeben sich, wie oben S. 25 ausgeführt wurde, noch die mannigfaltigsten Ausblicke auf die Ausbildung von Standortsformen bzw. die ökologische Bedingtheit entwicklungsphysiologischer Erscheinungen im Lebenslauf des Organismus. Wenn auch manches noch recht problematisch erscheinen mag, so zwingt doch die immer mehr in den Vordergrund rückende Forderung einer wahrhaft ökologischen Betrachtung der Mikroflora, wie sie z. B. von *Romell* und *Winogradsky*, wenn auch in erster Linie für den Mikrostandort, erhoben wurde, zunächst einmal die Probleme zu stellen, die sich aufdrängen. Eine Sichtung des zahllosen Einzelmaterials, das bisher für andere Mikroorganismen vorliegt, hier aber nicht vorgenommen werden kann, würde sicherlich schon Gesichtspunkte ergeben, auf denen weiter aufgebaut werden könnte.

Zusammenfassung.

Hohe Tannin-Konzentration ermöglicht eine Elektivkultur von *Aspergillus niger*, vermittels deren das Vorhandensein dieses Pilzes im Boden leicht festgestellt werden kann und das bis zu einem gewissen Grade einen quantitativen Vergleich verschiedener Böden erlaubt, wenn auch vorerst nur sehr annäherungsweise.

Es konnte festgestellt werden, daß der Pilz vom nördlichen zum südlichen Deutschland an Häufigkeit zunimmt. Auch in noch süd-

licheren Gegenden, einschließlich der Tropen, ist der Pilz stark verbreitet und ist auch in Norwegen nicht ganz selten. Wenn der Pilz also auch qualitativ als Kosmopolit erscheinen könnte, so zeigt er doch quantitative Abstufungen in seinem Vorkommen.

Er ist in Deutschland auf Südhängen häufiger als auf Nordhängen des gleichen Standorts. Er verhält sich innerhalb Deutschlands ähnlich wie eine mediterran-pontische Form unter den höheren Pflanzen. Jedoch erlaubt die für Mikroorganismen offenbar größere regionale Verbreitungsspanne nach Norden und Süden, bedingt durch die bessere Verbreitungsmöglichkeit und die kurze Entwicklungszeit, wenigstens in diesem Falle nicht die Anwendung derartiger Begriffe.

Offenbar ist jedoch die Temperatur für die Verbreitung nur der Grundfaktor; im übrigen scheint der Pilz sekundär weitgehend durch die Konkurrenz anderer Pilze, wie namentlich *Mucorineen*, beeinflußt zu werden; dabei dürften vermutungsweise Acidität, Menge der organischen Stoffe, niedere Temperatur, hohe Feuchtigkeit usw. als mucorineenbefördernd mitwirken.

In dieser Konkurrenz dürfte der Grund dafür vorliegen, daß der Pilz in Trockenrasen, Wiesen-, Weinberg- und Ackerböden im allgemeinen reinere Bestände bildet als in Wald- und Rohhumusböden.

Die Konzentration der Wasserstoffionen ist jedenfalls primär für die Verbreitung des Pilzes nicht entscheidend: dieser findet sich im südlichen Deutschland sowohl auf sauersten wie auf Carbonatböden in, mit der verwendeten Methode feststellbarer, maximaler Häufigkeit.

Es besteht Grund zu der Vermutung, daß der Pilz in Deutschland in nacheiszeitlichem Vordringen nach Norden ist.

Etwa $^1/_3$ der zahlreichen isolierten Stämme des Pilzes bildete auf Würze-Schrägagar Sklerotien, auch Stämme aus Norwegen. Aus tropischen Böden wurden Stämme isoliert, die bei 30° C ein von Sklerotien übersätes, völlig sporenloses Mycel bildeten, bei 20° C dagegen nur Sporen ohne jede Andeutung von Sklerotien. Auch die einheimischen sklerotienbildenden Stämme bildeten bei 20° C keine Sklerotien aus.

Auf die Bedeutung derartiger Untersuchungen für die noch so mangelhafte Kenntnis von der Ökologie der Mikroorganismen wird hingewiesen.

Literatur.

E. V. Abbott, Soil Science **16**, 207, 1923; Jowa State Coll. J. Sc. **1**, 15, 1926; Louis. Agr. Exp. Stat. Bull. **194**, 1926. — *L. Adametz*, Untersuchungen über die niederen Pilze der Ackerkrume. Dissertation Leipzig 1886.

F. H. van Beyma thoe Kingma, Centralbl. f. Bakt. II, **96**, 411, 1937. — *K. B. Boedijn*, Ann. Mycolog. **26**, 69, 1928. — *H. Bortels*, diese Zeitschr. **8**, 1, 1937.

H. Chaudhuri u. *G. S. Sacchar*, Ann. Mycolog. **32**, 90, 1934. — *D. Coleman*, Soil Science **2**, 1, 1916.

E. Dale, Ann. Mycolog. **10**, 457, 1912; **12**, 32, 1914. — *D. Dixon*, Austral. J. Exp. Biol. a. Med. Sc. **5**, 223, 1928.

D. Fehér, Untersuchungen über die Mikrobiologie des Waldbodens. Berlin, Jul. Springer, 1933. — *E. Fischer*, Ber. Schweiz. Bot. Ges. **37**, 103, 1928.

J. G. Gilman u. *E. V. Abbott*, Jowa State Coll. J. Sc. **1**, 225, 1927. — *Z. K. Gischitzkaja*, J. f. Bot. UAN (russisch) **6**, 107, 1937; Ref. Centralbl. f. Bakt. II, **97**, 479. — *H. N. Goddard*, Bot. Gaz. **56**, 249, 1913. — *H. Grundmann*, diese Zeitschr. **5**, 57, 1934.

I. Heintzeler, ebenda **10**, 92, 1938. — *K. Höfler*, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **55**, 606, 1937.

A. Janke u. *H. Holzer*, Centralbl. f. Bakt. II, **79**, 50, 1929. — *A. Janke* u. *M. Wozak*, diese Zeitschr. **5**, 338, 1934. — *C. N. Jensen*, Cornell (NY) Agr. Exp. Stat. Bull. **315**, 1912. — *H. L. Jensen*, Soil Science **31**, 123, 1931.

Ch. Killian u. *D. Fehér*, Recherches sur la microbiologie des sols désertiques. Bd. **21** Enzyclopédie biologique. Paris, P. Chevalier, 1939. — *L. Knudson*, J. of biol. Chem. **14**, 159, 185, 1913. — *A. Koch* u. *A. Oelsner*, Centralbl. f. Bakt. II, **45**, 107, 1919. — *W. Kubiena*, diese Zeitschr. **3**, 507, 1932.

E. L. Le Clerc u. *F. B. Smith*, Soil Science **25**, 435, 1928. — *E. Leischner-Siska*, Beih. Bot. Centralbl., Abt. B, **59**, 359, 1939.

P. Negroni, Physis (Buenos Aires) **15**, 193, 1939; Ref. Bot. Central **33**, 93. — *C. B. van Niel*, diese Zeitschr. **6**, 215, 1934. — *L. Niemeyer*, Bot. Arch. **7**, 347, 1924. — *A. Niethammer* (1), diese Zeitschr. **4**, 72, 1933. — *Dieselbe* (2), Die mikroskopischen Bodenpilze. 's-Gravenhage, W. Junk, 1937.

C. A. Oudemans, *J. A. Oudemans* u. *C. J. Koning*, Arch. Néerl. Sc. Nat. Sér. 2, **7**, 286, 1902.

A. Raillo, Centralbl. f. Bakt. II, **78**, 515, 1929. — *A. E. Rathbun*, Phytopathol. **8**, 469, 1918. — *A. Rippel*, Niedere Pflanzen. In *Blancks* Handb. d. Bodenlehre **7**, 239, 1931; Mikrobiologie des Bodens, ebenda **1**, Ergänzungsband, 440, 1939. Berlin, Jul. Springer. — *A. Rippel* u. *J. Kesseling*, diese Zeitschr. **1**, 60, 1930. — *L. G. Romell*, Centralbl. f. Bakt. II, **93**, 442, 1935/36.

Y. S. Sabet, Bull. Fac. Sc. Egypt. Univ. Nr. **5**, 1935. — *T. Sakamura*, J. Coll. Agr. Hokkaido Imp. Univ. **14**, 65, 1925. — *P. Scaramella*, Soc. Intern. Microbiol. Sez. Ital. **2**, 478, 1930. — *W. Schwartz*, Flora **23**, 386, 1928. — *O. J. O. Sopp*, Videnskabs. Selsk. Skr. Christiania Nr. 1, 1886. — *C. Stapp* u. *H. Bortels*, Centralbl. f. Bakt. II, **93**, 45, 1935. — *A. v. Szilvinyi*, Arch. Hydrobiol. Suppl. 14, „Tropische Binnengewässer", **6**, 512, 1936.

R. Takahashi, Ann. Phytopathol. Soc. Jap. **1**, 17, 1919. — *H. Tamiya* u. *S. Morita*, Bibliographie von Aspergillus. Sonderdruck aus Bot. Mag. **43** u. **44**, 1929 u. 1930. — *Ch. Thom* u. *M. B. Church*, The Aspergilli. London, Baillière, Tindall u. Cox, 1926. — *Ph. van Tieghem*, C. r. Acad. Sc. **65**, 1091, 1867; Ann. Sc. Nat. Bot. 5. Sér., **8**, 210, 1867. — *A. E. Traaen*, Nyt. Mag. Naturwiss. **52**, 20, 1914.

O. Verona (1), diese Zeitschr. **5**, 328, 1934; *Derselbe* (2), Secondo tributo di ricerche sulla microbiologia dei terreni della campagna Pisana. Pisa 1929; Ann. Agric. **15**, 127, 1935; zit. nach *Niethammer* (2), S. 40.

S. A. Waksman, Soil Science **2**, 103, 1916; **3**, 565, 1917. — *H. Walter*, Literatur bei *Heintzeler*. — *F. C. Werkenthin*, Phytopathology **6**, 241, 1916. — *H. Wenzl*, Beih. Bot. Centralbl. I, **52**, 73, 1934; Centralbl. f. Bakt. II, **89**, 353, 1934; diese Zeitschr. **5**, 358, 1934. — *J. A. Wilson* u. *G. Daub*, J. Amer. Leath. Chem. Ass. **20**, 400, 1925 — *S. Winogradsky*, La microbiologie oecologique. I. Congr. Microbiologistes franç. Paris 1938.

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.)

Beiträge zur Kenntnis der Morphologie und Physiologie der Actinomyceten.

Von

O. v. Plotho.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 1. Dezember 1939.)

Material und Methodik.

Die in folgendem beschriebenen Untersuchungen wurden an 15 von mir isolierten *Actinomyces*-Stämmen durchgeführt. Eine genaue Identifizierung nach einem der vorhandenen Systeme (*Krainsky*, *Waksman*, *Lehmann-Neumann*, *Bergey*) wurde nicht vorgenommen wegen der vor der Hand noch bestehenden Schwierigkeiten der Einordnung in ein festes System. Die Stämme werden daher mit fortlaufenden Nummern, *1*, *2*, *3*, . . . *15*, bezeichnet. Die Stämme *1* bis *9* (einschließlich) wurden von der Oberfläche von *Alnus incana* und aus Waldboden des Hainberges bei Göttingen isoliert. Reinkulturen wurden durch das Plattenverdünnungsverfahren erzielt. Die Stämme *10* bis *15* stammen aus dem Knöllcheninneren von *Alnus incana* des gleichen Standorts. Sie stimmen in den wichtigeren morphologischen und physiologischen Eigenschaften überein, als Typus dieser Stämme ist in den meisten Fällen Stamm *10* untersucht.

Alle Stämme sind nach *Orskow* (60), der fast ausschließlich morphologische Merkmale zur Systematisierung heranzieht, in die von ihm aufgestellte Gruppe 1 einzureihen. Sie gehören den langfädigen aeroben Arten an und besitzen ein einzelliges, echt verzweigtes Mycel ohne Querwände. Im Luftmycel teilt sich das Plasma durch „Konstriktion" der Fadenmembran. Der Durchmesser der Hyphen ist bei den einzelnen Formen verschieden, er schwankt zwischen 1,5 und 0,5 μ. Die Sporen sind zylindrisch oder kugelig, ihre Größe beträgt 1,5 bis 0,7 μ. Diese Merkmale blieben während der ganzen Untersuchungszeit konstant. Die physiologischen Eigenschaften erwiesen sich als abhängig von der Zusammensetzung der benutzten Nährmedien, der Temperatur, der Reaktion, der Belichtung usw., eine Abhängigkeit, die von allen Autoren festgestellt wurde. Die Abänderungen sind einfache Modifikationen und nicht erblich. Über eine spontan auftretende erbliche Veränderung wird später ausführlich berichtet werden.

Die Pilze wurden auf zahlreichen Nährmedien kultiviert, die im Autoklaven einige Minuten bei 1,5 Atm. Druck sterilisiert wurden. Zu ihrer

Herstellung wurden Salze und Präparate der Firmen *Merck* oder *Kahlbaum* verwendet, die meisten mit der Bezeichnung „pro analysi“ oder „purissimum“. Sämtliche Versuchsgefäße bestanden aus Jenaer Geräteglas, sofern nicht für die Versuche im ultravioletten Licht Kolben aus Quarzglas verwendet wurden. Die Wasserstoffionenkonzentration wurde mit den *Sörensen*schen Farbindikatoren und, wenn gefärbte Lösungen vorlagen, elektrometrisch (Platinelektrode) ermittelt. Bei allen Versuchen wurden zur Sicherheit und Kontrolle mehrere Kulturen gleichzeitig angelegt.

Morphologisches und kulturelles Verhalten.

Auswahl der Nährböden.

In neuerer Zeit wurde von *Jensen* (1928) aus Heide- und Waldboden ein Strahlenpilz isoliert, der ausgesprochen säureliebend war. Auch *Waksman* (1922) fand die Grenzwerte für die Entwicklung verschiedener saprophytischer *Actinomyces*-Stämme im sauren Bereich. Da die Wasserstoffionenkonzentration einen bedeutenden Faktor für das optimale Wachstum der Organismen darstellt, schien es geboten, sowohl die Reaktion des Waldbodens festzustellen, als auch die Aciditätsverhältnisse derjenigen Zone der Erlenwurzeln, in der der Actinomycet sich ausbreitet. Im Kalkboden des Hainberges war allerdings eine saure Reaktion nicht wahrscheinlich, die Acidität der Erlenwurzelrindenschicht war jedoch nicht vorauszusehen.

Die „aktuelle“ oder „wahre“ Acidität des Waldbodens, die durch wasserlösliche saure Bodensalze bedingt wird, wurde mit p_H 7,2 ermittelt, die durch Umsetzung von Aluminium- oder Eisensilikaten mit Neutralsalzen bei Gegenwart von Wasser im Boden entstehende „Austauschacidität“ mit p_H 6,5.

Zur Feststellung der in den Erlenknöllchen herrschenden Wasserstoffionenkonzentration wurde das von *Pietz* (62) bei *B. radicicola* angewandte Verfahren herangezogen. Gefrierschnitte gut entwickelter Erlenknöllchen wurden in die Farbindikatoren nach *Sörensen* gelegt und nach spätestens 30 Minuten untersucht. Die Farbstoffe zeigten dann innerhalb des Schnittes unter gegebenen Umständen je nach ihrem Umschlagspunkt eine charakteristische Verfärbung. Die Untersuchungen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Vegetationsperiode wiederholt und führten stets zum gleichen Ergebnis.

Die Acidität der Wurzelrindenschicht, in der der Actinomycet lebt, liegt bei einem p_H unter 5,2. Die Zellen jedoch, in die der Pilz eingedrungen ist, sowie die Hyphen und Involutionsformen selbst, sind weniger sauer. Sie entsprechen einem p_H von etwa 6,0. Es war also anzunehmen, daß die Medien zur Kultur der Strahlenpilze auf einen p_H-Wert einzustellen seien, der dem Neutralpunkt nahe liegt.

Beim Aufsuchen der günstigsten Kulturbedingungen mußten weiterhin die den Pilzen am besten zusagenden Kohlenstoffquellen gefunden werden. Es wurden daher zunächst Flüssigkeits- und Agarkulturen auf den gebräuchlichen Fleischextrakt-Peptonnährböden

(1,2 % Pepton, 0,8 % Fleischextrakt, 0,2 % NaCl, 1,8 % Agar) mit verschiedenen C-Quellen angelegt.

Aus der Tabelle I geht hervor, daß unter den Zuckern Glucose eine recht gute morphologische Entwicklung zuläßt. Von den meisten Pilzen wird Maltose der Saccharose vorgezogen, Dextrin ist aber entschieden die beste Kohlenstoffquelle. Von den höheren Alkoholen nimmt Glycerin vor Mannit die erste Stelle ein, das überhaupt als beste C-Quelle angesprochen werden muß. Neben der morphologischen Entwicklung läßt auch die Farbstoffbildung auf die Brauchbarkeit der Kohlenstoffversorgung schließen. Der Farbton vertieft sich, je nach der Verwertbarkeit der Energiequelle. Auch in dieser Beziehung erweisen sich Dextrin und Glycerin als das beste Versorgungsmaterial.

Für die späteren Untersuchungen war es jedoch notwendig, einen zusagenden Nährboden von genau bekannter Zusammensetzung zu haben. *Braun* und Mitarbeiter (11) gaben für Actinomyceten eine Grundlösung an, die sich nach einigen Modifikationen als recht brauchbar erwies. Sie wird im folgenden als „Stammlösung" bezeichnet und bestand nun aus: 0,1 % K_2HPO_4, 0,2 % NaCl, 0,005 % $MgSO_4$, 0,001 % $FeSO_4$, 0,001 % $CaCO_3$ (präzip.). Als C-Quelle wurden stets 2 % Glycerin hinzugefügt. Mit dieser Zusammensetzung wurde dann die Wirksamkeit verschiedener Stickstoffquellen geprüft. Zu diesen Versuchen diente als Ausgangssubstrat eine Lösung, die 1 % KNO_3 enthielt, die übrigen Lösungen wurden mit äquivalenten Mengen von $NaNO_3$, NH_4Cl und $(NH_4)_2SO_4$ hergestellt (Tabelle II).

Unter den vier Nährlösungen, deren Ergebnisse Tabelle II zeigt, gestatten die Ammoniumsulfat- und die Ammoniumchloridlösung keine befriedigende Entwicklung. Die geringe Entfaltung in beiden kann zurückgeführt werden auf die während des Kulturverlaufs eintretende starke Verschiebung der p_H-Werte in den sauren Bereich infolge Aufspaltung der N-Quelle. Bei den Ammoniumchloridversuchen macht sich außerdem die schädigende Wirkung des Chlorions geltend. Die Ammoniumsulfatlösung stellt für Stamm *6* und *7* kein ungünstiges Substrat dar, denn beide vertragen verhältnismäßig hohe Aciditätsgrade, alle anderen Stämme kommen in ihr aber nur mäßig oder sogar schlecht zur Entfaltung. In den beiden Nitratlösungen war das End-p_H dem Ausgangsstadium gegenüber nur unbedeutend verschoben, sie erwiesen sich im großen und ganzen als gleichwertig, doch ist die Kaliumnitratlösung etwas überlegen. Es wurde daher für die späteren Versuche in den meisten Fällen Kaliumnitrat als N-Quelle verwandt.

Charakterisierung der einzelnen Stämme.

Die Stämme *1* bis *4* sind die kräftigsten der untersuchten Formen. Ihr Myceldurchmesser beträgt 1,2 bis 1,5 μ, sie bilden auf allen festen

Tabelle I. Auswahl der
Alter der Kulturen: 27 Tage.

Kohlenstoffquelle Stamm	Glucose				Maltose				Saccharose			
	Wa.*	Verf. d. Agars **	Form u. Farbe d. Sp. ***	Ger. †	Wa.	Verf. d. Agars	Form u. Farbe d. Sp.	Ger.	Wa.	Verf. d. Agars	Form u. Farbe d. Sp.	Ger.
1	3	gelb	oval, gelblich	erdig	3	gelb	zylindr., schw. gelb	erdig	3	schw. gelb	zylindr., schw. gelb	erdig
2	3	„	„	„	3	„	„	„	3	„	„	„
3	3	„	rund, gelb	„	3	„	rund, gelb	„	3	„	rund, gelb	„
4	2	nicht verfärbt	rund, grau	„	3	„	schw. braun	„	3	nicht verfärbt	kugelig, weißgrau	„
5	3	hellbraun	„	„	3	schw. braun	kugelig, grau	„	3	schw. braun	„	„
6	3	graubraun	„	„	2	grau	„	„	2	graubraun	„	„
7	3	nicht verfärbt	oval, grau	schw. erdig	2	nicht verfärbt	—	—	3	braunrot	—	—
8	2	„	oval, gelblich	—	2	„	—	—	3	braun	—	—
10	2	„	—	—	2	gelblich	—	—	2	nicht verf.	—	—

0 = kein, 1 = gering, 2 = mäßig,

* Wa. = Wachstum. — ** Verf. d. Agars = Verfärbung des

Tabelle II. Auswahl
Alter der Kulturen: = 11 Tage.

N-Quelle Stamm	1 % KNO_3				0,85 % $NaNO_3$			
	Wa.	Sporenbildung	Farbe der Nährlösung	End-p_H	Wa.	Sporenbildung	Farbe der Nährlösung	End-p_H
1	3	3	gelb	7,9	3	3	gelb	7,2
3	3	3	„	7,5	3	3	„	7,3
4	3	3	„	7,9	3	3	„	7,3
5	2	2	farblos	6,9	2	2	farblos	7,0
6	2	1	„	6,7	2	1	„	7,0
7	2	0	schw. gelb	6,8	2	0	schw. gelb	7,1
8	3	0	„ „	7,0	2	0	„ „	7,3
10	2	0	farblos	6,9	1	0	farblos	6,8
11	1	0	gelb	6,9	1	0	„	6,9

0 = kein, 1 = gering, 2 = mäßig,

Kohlenstoffquellen.
Temp. 22° C. Anfangs-p_H 6,8.

Dextrin				Glycerin				Mannit			
Wa.	Verf. d. Agars	Form u. Farbe d. Sp.	Ger.	Wa.	Verf. d. Agars	Form u. Farbe d. Sp.	Ger.	Wa.	Verf. d. Agars	Form u. Farbe d. Sp.	Ger.
4	gelbbraun	zylindr., schw. gelb	erdig	4	braun	zylindr., schw. gelb	erdig	2	schw. gelb	zylindr., schw. gelb	erdig
4	„	„	„	4	„	„	„	2	„ „	„	„
4	„	rund, gelb	„	4	„	rund, gelb	„	2	„ „	rund, gelb	„
3	schw. gelb	kugelig, gelb	„	4	„	braun	„	2	nicht verfärbt	kugelig, grau	„
2	dunkelbraun	kugelig, grau	„	3	dunkelbraun	dunkelbraun	„	3	braun	„	„
4	„	„	„	4	braunschwarz	oval, grau	„	3	„	„	„
3	rotbraun	—	—	4	braunrot	„ „	schw. erdig	2	nicht verfärbt	oval, grau	schw. erdig
2	„	—	—	3	dunkelbraun	—	—	2	„	—	—
3	schw. gelb	—	—	3	gelblich	—	—	3	schw. gelb	—	—

3 = gut, 4 = sehr gut.

Agars. — *** Form und Farbe der Luftsporen. — † Geruch.

der Stickstoffquellen.
Temp. 22° C. Anfangs-p_H 7,0.

0,65 % $(NH_4)_2SO_4$				0,53 % NH_4Cl			
Wa.	Sporenbildung	Farbe der Nährlösung	End-p_H	Wa.	Sporenbildung	Farbe der Nährlösung	End-p_H
2	1	gelb	5,5	1	1	gelb	4,9
2	1	„	5,6	1	1	„	5,0
2	2	farblos	5,3	1	1	farblos	5,5
2	2	schw. braun	5,6	2	2	schw. braun	5,6
3	2	farblos	5,9	2	0	farblos	5,7
3	1	„	5,1	1	1	„	5,0
2	0	„	5,9	2	1	„	5,5
1	0	„	5,5	2	0	schw. gelb	5,4
1	0	„	5,5	2	0	„ „	5,3

3 = gut, 4 = sehr gut.

Nährböden reichlich Sporen (Tabelle I), auf Nährlösungen entwickeln sich zusammenhängende weißgelbe Sporendecken von unregelmäßiger Oberfläche, die denen der Schimmelpilze ähneln.

Die Stämme *5* und *6* besitzen zarteres Mycel. Die Sporenbildung ist bei beiden auf allen festen Nährböden stets reichlich, in Lösungen entwickelt Stamm *6* oft nur spärlich oder gar keine Sporen (Tabelle II). An ihm wurde eine besondere Art der Entwicklung beobachtet, auf die näher eingegangen werden muß.

In frühen Wachstumsstadien finden sich nämlich in Flüssigkeits- und auf Agarkulturen reichlich stark verdickte, zylindrische, stark grampositive Stäbchen mit abgerundeten Ecken. Ihre Breite beträgt bis zu 2,3 μ, das ist mehr als das Doppelte der normalen Pilzfäden, ihre Länge ist nicht konstant, es kommen Stäbchen bis zu 7 μ Länge, oft aber auch kürzere vor. Ein Auskeimen findet nie aus der Mitte heraus, sondern stets nur von den Ecken aus statt. Der Keimschlauch ist dünner als das Mutterstäbchen, er besitzt etwa die Breite der normalen Hyphen. Manchmal erfolgt das Auskeimen nur an *einer* Ecke, meistens keimen aber zwei Ecken zugleich aus, seltener sieht man Bilder, die drei oder alle vier Ecken mit jungen Keimschläuchen zeigen (Abb. 1). Nach und nach verschmälert sich das „Keimstäbchen" und ist als solches nicht mehr zu erkennen. Die Keimstäbchen fanden sich auch in Nährmedien, die der normalen Entwicklung des Organismus abträglich sind, z. B. in einer Kultur in „Stammlösung" + 2 % Glycerin + 5 % NH_4Cl. Die Mycelbildung war durch die hohe Salzkonzentration (44) und die geringe Eignung des Ammoniumchlorids weitgehend unterdrückt, eine Luftsporenentwicklung hatte nicht stattgefunden, die verdickten „Keimstäbchen" fanden sich jedoch reichlich in normaler Ausbildung. Nach Färbung lebender Stäbchen mit verdünntem Methylenblau lassen sich oft dunkle Körper an beiden Polen, die etwas aufgetrieben erscheinen, erkennen. Sie bestehen nicht aus Volutin und nicht aus Fett. Hervorgehoben muß noch werden, daß das Auskeimen immer auf dem gleichen Nährboden, auf dem die Stäbchen entstanden, erfolgt, und nicht erst nachdem sie auf neues Substrat gebracht worden sind. Die auswachsenden Hyphen verzweigen sich bald und bilden ein dichtes Fadengeflecht, aus dem die normalen kugeligen bis ovalen Luftsporen auf die typische Weise entstehen. Aus ihnen gehen

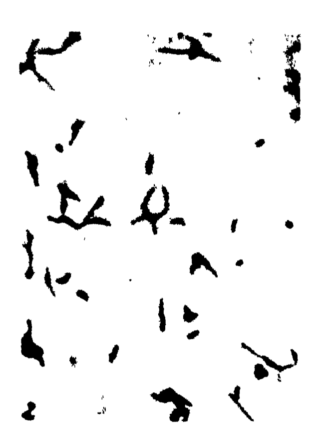


Abb. 1. Stamm *6*: Keimstäbchen. Färbung: Methylenblau. Vergr. etwa 1 : 1440.

auf dem gleichen Nährboden nie wieder neue Mycelteile hervor, werden sie aber auf neues Substrat gebracht, so entsteht an einer oder an mehreren Stellen ein Keimschlauch.

Die Gestalt und die Keimung der beschriebenen Stäbchen gleicht genau den von *Lieske* (1921, S. 85ff.) als „Vierhyphensporen" beschriebenen und abgebildeten. Er fand sie ausschließlich bei aeroben Stämmen. In der späteren Literatur sind sie, soweit ich sehe, nur einmal wieder beschrieben (43), und zwar bei einem anaeroben, pathogenen Actinomyceten. Sonst werden sie nicht erwähnt, offenbar wurden sie nicht wieder gefunden. Für ihre Entstehung möchte *Lieske* eine Kernverschmelzung und damit einen sexuellen Vorgang annehmen, die von ihm beschriebene Entstehungsweise konnte aber nicht beobachtet werden. Zweifellos sind jedoch die beschriebenen Formen höchst auffällig und biologisch sicher keineswegs bedeutungslos.

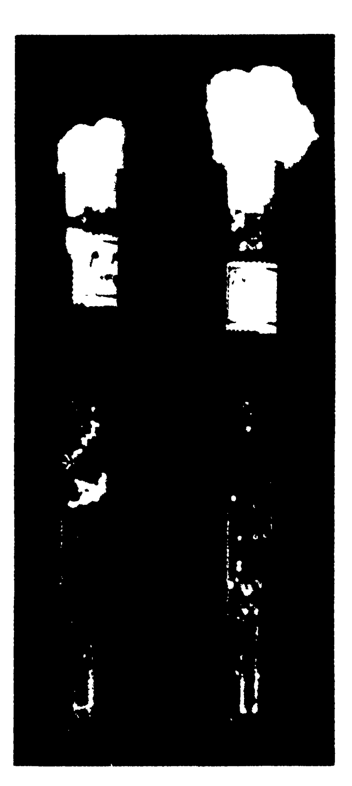


Abb. 2. Stamm *10* u. *12*: Versporung einzelner Kolonien inmitten einer unversporten Kultur.

Die Oberflächenkulturen der mit den Nummern *7*, *8* und *9* bezeichneten Stämme sind weich, von teigiger Konsistenz und nicht fest mit dem Substrat verwachsen. Die Bildung von Luftsporen erfolgte nicht unter allen Gegebenheiten (Tabelle I), die geringere Neigung zur Sporenbildung trat während der ganzen Untersuchungszeit hervor.

Noch weit größere Unregelmäßigkeiten zeigten in dieser Beziehung die Stämme *10* bis *15*. Sie bilden alle auf Agarnährböden ein sehr fest zusammenhängendes, glänzendes, fest mit dem Substrat verwachsenes Mycel von knorpeliger Beschaffenheit. In Lösungen, die sie vollkommen klar lassen, formen sie kleine fest zusammenhängende Mycelkügelchen von verschiedener Größe. Lange Zeit hindurch bildeten diese Stämme auf flüssigen und festen Nährböden in vielen Generationen keine Sporen. Dann stellte sich *bei allen* fast gleichzeitig ohne erkennbare Veränderung der Außenbedingungen Sporulation ein, und zwar auf den verschiedensten Nährböden. In einer 4 Wochen alten Kultur von Stamm *10* auf Fleischextrakt-Pepton-Dextroseagar (Kulturtemperatur 22° C) z. B. zeigten sich einige versporte Kolonien, die über die ganze Kultur verstreut waren. In einer Kultur von Stamm *14* auf Fleisch-

extrakt-Pepton-Glycerinagar waren nach 18 Tagen Kulturdauer in der Mitte Sporen erschienen, oberhalb und unterhalb dieser versporten Zone waren die Kolonien gut entwickelt, aber vollständig unversport (Abb. 2). Es sei noch ausdrücklich bemerkt, daß die sporenbildenden Stämme im übrigen morphologisch und kulturell völlig der sporenlosen Ausgangsform entsprachen. Die anderen Stämme *11, 12, 13, 15* zeigten ganz ähnliche Erscheinungen. Beim späteren Wachstum breitete sich die Versporung nicht mehr aus, die unversporten Kolonien blieben auch fernerhin unversport.

In zahlreichen Versuchen wurde das weitere Verhalten der versporten und unversporten Kolonien geprüft. Von allen sporulierenden Stämmen wurden je zehn Schrägagarröhrchen von Fleischextrakt-Peptonagar + Dextrose und Glycerin mit einer versporten und einer unversporten Kolonie beimpft. Hierdurch sollte einerseits festgestellt werden, ob die Zusammensetzung des Nährbodens einen Einfluß auf die Versporung auszuüben vermochte, denn gewisse Beobachtungen schienen die Annahme zu rechtfertigen, daß die Versporungsneigung auf Dextroseagar besonders ausgeprägt sei. Andererseits sollte die „Erblichkeit“ der sprungweise aufgetretenen Versporung geprüft werden.

Ein Unterschied in der Versporungshäufigkeit zwischen Dextrose- und Glycerinagar konnte nicht festgestellt werden. In allen Versuchen blieb auf beiden Agararten das versporte Material durch viele Generationen während der ganzen Untersuchungszeit versport. Bei den mit unversporten Kolonien beimpften Kulturen zeigte sich nach der ersten Überimpfung eine Aufspaltung. Ein Teil der Kulturen blieb vollständig unversport, ein anderer Teil wies zwischen vielen unversporten einige versporte Kolonien auf, andere Kulturen waren vollständig versport. Wurde von den versporten Kolonien bzw. Kulturen weiter geimpft, so entstanden nur versporte Kolonien, während die in der ersten Generation unversport gebliebenen auch weiterhin nicht versporten. In den älteren, reichlich sporulierenden Kolonien entstanden oft Zerreißungen an der Oberfläche infolge der beim Wachstum ausgelösten Spannungen.

Es handelte sich also um plötzlich auftretende Änderung gewisser Eigenschaften, die bei der Weiterzucht konstant bleiben. *Lieske* (1921) hat diese Erscheinung bei Actinomyceten ausführlich besprochen. Er betont immer wieder ihre überaus große Variabilität „in fast allen morphologischen und physiologischen Eigenschaften“. In ähnlichem Sinne äußern sich *Conn* (15) und *Waksman* (1927). Auch *Jensen* (1931) berichtet von einem Bodenactinomyceten, bei dem in Einzellkulturen spontan ein neuer Typ entstand. Ebenso beobachteten *Rippel* und *Witter* (71) das spontane Auftreten von sporenlosen Sektoren in einer sonst sporenführenden Kolonie. *Tempel* (80) dagegen konnte an fünf Stämmen von Actinomyceten „unter

konstanten Außenbedingungen keine sprungweisen Veränderungen irgendwelcher morphologischer oder physiologischer Eigenschaften" feststellen. Auch *Duché* (21) beobachtete keinerlei Variation. *Orskow* nimmt wenigstens für einige morphologische Eigenschaften (darunter *nicht* die Sporenbildung) Konstanz an.

Dampfspannungsbereich und Versporung.

Die Erfahrungen an den Stämmen *10* bis *15* bestätigen aufs neue, daß die Sporenbildung keine unveränderliche Eigenschaft darstellt. Im folgenden wurde versucht, den Dampfspannungsbereich, in dem Actinomyceten zu leben vermögen, sowie Anhaltspunkte für ein von Außenbedingungen gesetzmäßig abhängiges Einsetzen der Sporenbildung innerhalb dieses Bereichs aufzufinden. Hierzu müssen einige kurze Erläuterungen vorangeschickt werden.

In einer Arbeit von *Walter* (90) findet sich eine Literaturzusammenfassung, aus der hervorgeht, daß eine bestimmte Abhängigkeit des Wachstums vom Plasmaquellungszustand besteht. *Walter* stellte dann fest, daß die Voraussetzung für Wachstum überhaupt ein ganz bestimmter Quellungszustand ist und daß unter sonst gleichen Bedingungen das Wachstum um so intensiver ausfällt, je stärker das Plasma gequollen ist. Unterhalb eines bestimmten Grenzwertes des Quellungszustandes, der für bestimmte Arten verschieden hoch liegt, hört Wachstum auf. Um zu diesen Ergebnissen zu kommen, mußte *Walter* imstande sein, eine Änderung des Plasmaquellungszustandes willkürlich herbeizuführen. Er wählte hierzu nicht das Mittel, gewisse Stoffe den Kulturen hinzuzufügen, — ein Mittel, das eine Änderung der Plasmaquellung wohl herbeizuführen vermöchte, das aber auch chemische Veränderungen auslösen und daher früher oder später das Plasma schädigen könnte —, sondern ging gleichsam mechanisch vor, indem er die Tatsache benutzte, daß jedem Quellungszustand eine ganz bestimmte Saugkraft und dieser wieder eine relative Dampfspannung von ganz bestimmter Größe entspricht. Er änderte daher die Plasmaquellung durch Änderung der relativen Dampfspannung. Das Variieren dieser relativen Dampfspannung wurde in einem abgegrenzten Luftraum mit Hilfe von mehr oder weniger stark konzentrierter Schwefelsäure erreicht. Diese Methode wurde grundsätzlich bereits von *Renner* (68) und *Walderdorf* (89) angewendet, doch fügte *Walter* ihr einige Verbesserungen hinzu.

Mit der im folgenden beschriebenen Versuchsanordnung wurden eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt, die die Verfolgung des Wachstums und der Sporenbildung bei den Strahlenpilzen unter verschiedenen Dampfspannungen gestatteten:

Runde Glasschälchen von 4 cm Durchmesser und 1,5 cm Höhe wurden mit Schwefelsäure bestimmter Konzentration bis 1 cm hoch gefüllt und mit aufgeschliffenem Glasdeckel luftdicht verschlossen. Daß ein luftdichtes Abschließen wirklich erreicht wurde, geht daraus hervor, daß über reinem Wasser der Deckel stets beschlagen war, während er bei Herabsetzen der Dampfspannung nie feucht erschien. Vor dem Verschließen war der Glasdeckel mit drei möglichst gleichmäßig aufgetragenen Agartropfen (Fleischextrakt-Pepton-Dextrose) versehen, die nach völligem Eintrocknen beimpft wurden. Die Kulturen standen bei Zimmertemperatur.

Tabelle III.
Alter der Kulturen 15 Tage. Zimmertemperatur. Ausgangs-p_H 6,8.

Relative Dampfspannung H_2SO_4	100 % 0 %		99 % 2 %		98 % 4 %		97 % 6 %		96 % 8 %		95 % 10 %		93 % 12 %		90 % 16,32 %	
Stamm	Wa.*	V.**	Wa.	V.	Wa.	V.	Wa.	V.	Wa.	V.	Wa.	V.	Wa.	V.	Wa.	V.
1	3	3	3	3	2	2	1	2	1	2	—	—	—	—	—	—
3	2	2	3	3	2	2	1	2	—	—	—	—	—	—	—	—
4	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	1	2	—	—	—	—
5	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	2	2	1	2	—	—
6	2	2	2	—	2	—	2	—	1	—	—	—	—	—	—	—
7	3	—	3	—	2	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8	3	—	3	—	2	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
9	2	—	2	—	2	2	2	3	—	—	—	—	—	—	—	—
10	2	—	2	—	2	—	2	—	1	—	—	—	—	—	—	—
11	2	—	2	—	2	—	2	—	1	—	—	—	—	—	—	—
14	2	—	2	—	2	—	2	—	1	—	—	—	—	—	—	—

— = kein, 1 = gering, 2 = mäßig, 3 = gut.
* Wa. = Wachstum. ** V. = Versporung.

Tabelle III zeigt die Ergebnisse. Alle Stämme keimten am schnellsten und entwickelten sich am kräftigsten bei einer relativen Dampfspannung von 100 % mit der einzigen Ausnahme von Stamm *3*, bei dem das Wachstum bei 99 % etwas intensiver war. Dies könnte möglicherweise hervorgerufen sein durch etwas ungleiche Dicke des Agartropfens oder nicht ganz gleichmäßige Beimpfung. Eine Nachprüfung hatte in einem Falle das gleiche Ergebnis, im zweiten war das Wachstum bei 100 % besser, so daß für diesen Stamm keine sichere Aussage für das Optimum des Feuchtigkeitsgrades gemacht werden kann. Im allgemeinen scheint der Dampfspannungsbereich, in dem Actinomyceten zu leben vermögen, nicht allzu groß zu sein. Immerhin geht er über den der Bakterien hinaus und die Grenzwerte liegen zum Teil beträchtlich tiefer. Das stimmt gut mit den Untersuchungen von *Jensen* (1934) überein, der aus Zählungen von Mikroorganismen in 50 verschiedenen Böden den Schluß ableitete, daß die relative Häufigkeit der Actinomyceten zu den Bakterien mit abnehmender Feuchtigkeit wachse.

Was das Einsetzen der Sporenbildung betrifft, so zeigte Stamm *9* ein bemerkenswertes Ergebnis. Er bildete bei Dampfspannungen von 100 % und 99 % keine Sporen, die Versporung setzte aber bei 98 % lebhaft ein und steigerte sich noch bei 97 %. Dieses Ergebnis läßt den Schluß auf die Abhängigkeit der Sporenbildung von dem Feuchtigkeitsgrad der Luft bzw. des Nährbodens zu, ein Schluß, den zahlreiche Beobachtungen in anderem Zusammenhang bereits nahelegten. So beginnt z. B. in Schrägagarröhrchen die Versporung in vielen Fällen, wenn auch nicht regelmäßig, am oberen Ende des Röhrchens, also dort, wo der Feuchtigkeitsgrad des Nährbodens am geringsten ist. Und bei

Kultur auf Kartoffeln im Reagensglas setzt die Sporulation fast immer am oberen Teil des Kartoffelstückchens, das am stärksten ausgetrocknet ist, ein, worauf bereits *Kießling* (40) aufmerksam machte. Allerdings trat bei den übrigen Stämmen ein Zusammenhang zwischen Feuchtigkeitsgrad und Einsetzen der Sporulation nicht so eindeutig hervor.

Untersuchungen mit verschiedenen Energiequellen.

Aus einer großen Anzahl von Kulturversuchen in „Stammlösung" + 1 % Kaliumnitrat und verschiedenen Salzen der niederen organischen Säuren (0,5 %)[1] sei nur erwähnt, daß das Wachstum aller Stämme auf diesen Nährböden äußerst spärlich war. Auf Natriumformiat trat überhaupt niemals Entwicklung ein, Essigsäure erwies sich als etwas verwendbarer, Bernsteinsäure und Äpfelsäure waren sehr wenig geeignet Diese Ergebnisse stehen im allgemeinen im Einklang mit denen anderer Autoren (*Waksman* 1927). Ebenso wurden Versuche gemacht mit Phenol und Toluol als C-Quelle, da nach neueren Angaben [*Gray* und *Thornton* (31), *Söhngen* (78)] *Mycobakterien* (*agrestis*) diese Verbindungen zersetzen. Das Ergebnis war ebenfalls recht unbefriedigend. Auf Phenol trat nur in einem Falle (Stamm *S*) ein sehr geringes Wachstum ein, auf Toluol zeigten die anspruchslosen Stämme *3* und *5* geringe Mycelentwicklung und geringe Versporung, alle anderen wuchsen nicht. Bierwürze ist für alle ein ungünstiger, Hefekochsaft ein vorzüglicher Nährboden. In ihm finden sich neben leicht zersetzlichen Stickstoffverbindungen wahrscheinlich irgendwelche Wuchskatalysatoren, die günstig auf die Entwicklung wirken. Ebenso gedeihen alle Stämme gut auf Kartoffeln. Stamm *6* und *7* färben sie braunschwarz, bei den anderen Stämmen bleibt der Farbton heller. Stamm *1*, *2* und *3* scheiden auf der Sporenschicht große, gelbe, glänzende Flüssigkeitstropfen aus, auf deren Inhalt sogleich eingegangen werden wird.

Eine Versuchsreihe in „Stammlösung" + 2 % Glycerin und 1,3 % Asparagin (die 1 % KNO_3 äquivalente Menge) verdient besonders erwähnt zu werden (Tabelle IV). Asparagin scheint nach Wachstum und Farbstoffbildung für alle Stämme eine ausgezeichnete Stickstoffquelle zu sein, was auch oft angegeben wird (67). Die kräftigen Stämme *1* bis *4* bildeten dicke, zusammenhängende Oberflächendecken mit zahlreichen Sporen und auch die zarteren Stämme hatten bis auf Stamm *10* und *11* reichlich Sporen entwickelt.

Die mikroskopische Untersuchung des Mycels wies jedoch bei Stamm *10* und *11* Bilder auf, die möglicherweise als Mangelerscheinung gedeutet werden müssen. Beide Stämme bilden bei normalem Wachs-

---

[1] Die Nährlösungen waren stets mit Natronlauge oder Natriumcarbonat auf p_H 6,8 bis 7,0 eingestellt.

Tabelle IV.
Alter der Kulturen: 11 Tage, Temperatur 22° C, Ausgangs-p_H 7,0.

Nummer des Stammes	Wachstum	Sporenbildung	Farbe der Nährlösung	End-p_H
1	4	4	dunkelbraun	8,2
3	4	4	„	7,0
4	4	3	„	7,9
5	4	4	braun	8,3
6	4	4	dunkelbraun	8,0
7	4	3	braun	7,2
8	4	4	„	7,3
10	4	0	„	8,0
11	4	0	„	8,1

tum auf allen Nährböden ein fest zusammenhängendes, mit fett- und wachsartigen Stoffen reichlich inkrustiertes Mycel (vgl. weiter S. 50.) Auf Zusatz von Sudan III und α-Naphthol lassen sich in den Hyphen zahlreiche kleine Fetttröpfchen nachweisen, und auch außerhalb der Fäden liegen kleine, rund und buchtig begrenzte Fettplättchen. Gegenüber anderen Nährböden traten diese Fetttröpfchen reichlicher auf und waren größer, wenn Asparagin als Stickstoffquelle benutzt wurde. In anderen, makroskopisch vollkommen gesund aussehenden Kulturen, in denen Asparagin als alleinige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle wirkte, trat die vermehrte Fettspeicherung nicht so auffällig zutage, aber auch hier war sie deutlich bemerkbar. Die Ursache für die größere Verfettung bei Vorhandensein einer besonderen Kohlenstoffquelle dürfte in einem relativen Stickstoffmangel bei Versorgung mit Asparagin liegen.

Eine Analogie zu diesen Befunden liegt in den Ergebnissen, die *Heide* (33) vor einigen Monaten für *Endomyces vernalis* veröffentlichte. Schon vor längerer Zeit wurde weiterhin für *M. tuberculosis* nachgewiesen, daß die Aufspeicherung beträchtlicher Mengen stickstofffreier Reserven in Form von Fett und Wachs im Zusammenhang mit der Zusammensetzung der Nährböden (29) steht; es scheint auch in unserem Falle eine Beeinflussung der Fettspeicherung durch den Nährboden vorzuliegen.

Ferner muß auf die Tröpfchenbildung in den Asparaginkulturen, die bereits beim Wachstum auf Kartoffeln erwähnt wurde, eingegangen werden. Auf der Oberflächendecke von Stamm *1* traten in älteren Kulturen, über die ganze Decke verstreut, große, hellgelbe, zähflüssige Tropfen auf, wie sie bei Schimmelpilzen nicht selten vorkommen. Sie besaßen ein p_H von 8,0, mit *Neßlers* Reagens erfolgte eine starke Ammoniakreaktion und nach Ansäuern mit Essigsäure entstand auf Zusatz von Calciumchlorid ein feiner Niederschlag, der das Vorkommen von Oxalsäure wahrscheinlich machte. Es darf daher auf eine wässerige Lösung von Ammoniumoxalat als Stoffwechselprodukt einer weitgehenden Eiweißzersetzung in den Tröpfchen geschlossen werden.

Nitrit als Stickstoffquelle.

Über die Verwertbarkeit von Nitriten durch Actinomyceten lauten die Angaben der Autoren sehr widersprechend. Schon *Beijerinck* (6) macht im Jahre 1900 die Feststellung, daß der von ihm untersuchte Organismus Nitrite in großer Verdünnung auszunutzen vermochte. Bei *Krainsky*, *Waksman* und *Guittonneau* (32) finden sich ähnliche Angaben. *Fousek* (26) dagegen konnte in Nitritlösungen nie Wachstum erzielen. *Tempel* (80) verwendete Natriumnitrit und berichtet von mäßigem bzw. geringem Wachstum bei drei von vier untersuchten Stämmen.

Tempel äußert aber selber Zweifel daran, daß ihre Stämme tatsächlich das dargebotene Nitrit verwertet hätten und nicht vielmehr die Ammoniakverbindungen der Laboratoriumsluft ausnutzten. Von keinem Forscher wurde bisher versucht, diese Verbindungen auszuschließen und auf diese Weise zu einem sicheren Urteil zu kommen.

Zu diesem Zwecke wurde die Nährlösung (50 ccm Stammlösung + 2 % Glycerin + 0,01 % KNO_2) in 100 ccm Erlenmeyerkolben gefüllt und sämtliche Kolben nach Sterilisation in eine große Glasschale gestellt, die mit aufgeschliffenem, jedoch in der Mitte durchbohrtem Deckel luftdicht verschlossen wurde. Die Durchbohrung des Deckels wurde mit durch Schwefelsäure befeuchtetem Kieselgur verschlossen. Kulturen und Schale wurden zu Beginn des Versuchs an der Wasserstrahlpumpe evakuiert. Darauf wurde durch Lauge und Säure von den Ammoniakverbindungen der Laboratoriumsluft befreite „reine" Luft neu eingeleitet. Evakuierung und Neubelüftung wurden mehrere Male wiederholt. Während der Wachstumszeit wurde in Abständen von je 3 Tagen die Luft in der Glasschale (stets nach Durchleiten durch Lauge, Säure und destilliertes Wasser) erneuert.

Tabelle V.

Alter der Kulturen 30 Tage. Temperatur 18 bis 20° C. Ausgangs-p_H 6,5.

Stamm	Wachstum	Farbe der Lösung	Geruch	Luftsporen	End-p_H
1	1	hellgelb	stark erdig	2	7,2
3	2	„	„	2	7,1
4	2	wasserhell	„	3	7,2
5	1	„	„	2	7,5
6	1	gelbgrün	„	2	7,3
7	2	dunkelgelb	„	2	6,6
9	2	wasserhell	—	—	7,1
10	1	„	—	—	7,2
11	2	„	—	—	7,1
13	2	„	—	—	7,1
15	2	„	—	—	7,1

Alle Stämme hatten, wie Tabelle V zeigt, das Kaliumnitrit als Stickstoffquelle angenommen, doch war das Wachstum überall spärlich. Makroskopisch fiel auf, daß die Mycelkügelchen bei den Stämmen *10* bis *15* durchweg bedeutend größer waren als in zuträglichem Nährsubstrat und gleichsam aufgelockert, fast flockig erschienen. Die mikroskopische Untersuchung des Mycels ergab bei allen Stämmen unnormale

Bilder. Es kamen dünne, wellenförmig gewachsene Fäden vor, neben verdickten, die ovale bis runde Auftreibungen im Hyphenverlauf aufwiesen. Diese erreichten das Drei- und Vierfache des regulären Fadendurchmessers. Häufig fanden sich Deformationen an den Verzweigungsstellen und das Ende des Fadens war oft blasenförmig aufgebläht. Nach diesem durchaus krankhaft erscheinenden Mycelbefund ist anzunehmen, daß das kümmerliche Wachstum nicht allein auf die Art und Spärlichkeit (0,01 %) der Stickstoffquelle zurückzuführen ist, sondern seinen Grund mindestens teilweise in einer vom KNO_2 ausgeübten Giftwirkung hat.

Bindung des Luftstickstoffs.

Mit Hilfe der gleichen Versuchsanordnung wurde das Vermögen der Pilze geprüft, den elementaren Luftstickstoff zu assimilieren. Als Nährlösung wurde „Stammlösung“ + 2 % Glycerin + 0,0005 % Na_2MoO_4 verwandt. Stamm *11* ist imstande, den Stickstoff der Luft zu verwerten. Auf 100 ccm Nährlösung wurden in 28 Tagen bei Zimmertemperatur bis zu 5 mg N gebunden. Über diese Versuche wird in anderem Zusammenhang ausführlich berichtet werden.

Wachstumskurven der verschiedenen Stämme.

Die in der nachstehenden Tabelle VI zusammengefaßten Ergebnisse stammen aus zwei parallelen Versuchsreihen.

Tabelle VI.

Stamm	Mycelgewicht in mg nach Kulturtagen					Zucker im Substrat in mg nach Kulturtagen				
	7	15	20	30	70	7	15	20	30	70
3	79	198	212	210	185	309	113	0	0	0
4	67	179	202	190	150	164	107	0	0	0
5	91	120	138	110	77	243	98	0	0	0
6	23	25	26	27	29	304	224	211	175	79
7	18	23	24	26	28	305	221	220	181	89
8	19	23	24	27	29	295	235	221	167	78
10	14	18	18	23	18	306	242	240	189	99

Stamm	p_H nach Kulturtagen					
	7	15	20	30	70	90
3	6,89	8,14	8,29	8,39	—	—
4	6,28	8,29	8,30	8,32	—	—
5	6,98	8,21	8,54	8,20	—	7,2
6	5,62	5,15	4,83	4,89	5,35	—
7	5,43	4,83	4,33	4,41	4,63	—
8	5,25	4,83	4,44	4,42	4,81	—
10	6,05	5,82	5,17	4,80	4,95	—

Je 60 ccm Fleischextrakt-Pepton-Dextrose-Lösung (1 %). Kulturtemperatur 22° C. Ausgangs-p_H 6,8.

Auf Grund dieser Versuche zerfallen die Actinomyceten in der benutzten Nährlösung in zwei Gruppen: in solche, die die Lösung während ihres Wachstums alkalischer machen, und in solche, die die Acidität des Substrats ziemlich beträchtlich erhöhen. Die erste Gruppe umfaßt die Stämme *3*, *4* und *5*. Alle wachsen schnell und kräftig und sporulieren reichlich; Stamm *5* entwickelt sich am schnellsten, Stamm *3* am langsamsten. Nach Art der *Aspergillaceen* bilden sie eine zusammenhängende Myceldecke auf der Substratoberfläche. Schon zwischen dem 15. und 20. Kulturtag ist der gesamte Zucker verschwunden. Das Mycelgewicht erreicht dann seinen höchsten Betrag. Die H-Ionenkonzentration fällt bei Stamm *3* und *4* bis zum Versuchsende ab. Diese Erscheinung dürfte auf autolytische Vorgänge zurückzuführen sein. *Behr* (5) hat in quantitativen Untersuchungen an fünf *Aspergillus niger*-Stämmen nachgewiesen, daß als Autolyseprodukt der organischen Stickstoffverbindungen neben Aminosäuren immer Ammoniak auftritt, und auf das Auftreten von Ammoniakverbindungen darf auch hier das Ansteigen der Alkalität zurückgeführt werden, denn in Kulturen dieser Stämme und dieses Altersstadiums war Ammoniak immer nachweisbar.

Es ist wahrscheinlich — was auch *Behr* betont —, daß schon in verhältnismäßig frühem Stadium autolytische Vorgänge einsetzen. Zu Beginn der Kultur überwiegen aber die Wachstumserscheinungen und ihre Auswirkungen, zur Zeit des höchsten Mycelgewichtsstandes halten sich Autolyse und Wachstum in ihren Auswirkungen die Waage und gegen das Ende des Vegetationsablaufs überwiegen die Autolyseprodukte. Der Rückgang der Alkalität bei Stamm *5*, der schon nach 30 Tagen angedeutet, nach sehr langer Kulturdauer (90 Tage) aber erheblich ist, könnte aus einer ungewöhnlich großen Vermehrung saurer organischer Zwischenprodukte des Eiweißzerfalls erklärt werden, die im Zusammenhang steht mit dem schon zwischen dem 20. und 30. Kulturtage einsetzenden intensiven Mycelschwund, der bei diesem Stamm außerordentlich schnell eintrat und am Ende der Untersuchungszeit bereits 44 % des Höchstgewichtsstandes betrug. Bei den beiden anderen Stämmen verlief dagegen der Mycelverfall weit langsamer; ihr Mycelschwund betrug beim Abschluß der Beobachtungen nur 13 bzw. 22,7 %. Während des Kulturverlaufs nahm die Lösung der drei Pilze einen immer tiefer werdenden braunen Farbton an und war beim Schluß der Untersuchung tiefdunkelbraun gefärbt. Auch dies stimmt mit den Beobachtungen an *Aspergillaceen* überein; es darf zurückgeführt werden auf die Bildung stickstoffhaltiger Huminstoffe, denn beim Ansäuern fielen derbe braune Flocken dieser Substanzen aus den Kulturlösungen aus.

Ganz anders verhielten sich die Stämme der zweiten Gruppe, die feinfädigeren, keine Oberflächendecken bildenden Organismen. Ihr Mycel-

gewicht bleibt ganz erheblich hinter dem der 1. Gruppe zurück. Mycelgewicht und Zuckerverbrauch stiegen zu Beginn des Versuchs verhältnismäßig schnell an, wobei sofort die H-Ionenkonzentration erheblich erhöht wurde. Später war Zucker im Substrat noch reichlich vorhanden, aber bei einer so hohen Acidität vermochten die Pilze nur mäßig zu wachsen, so daß die Mycelgewichtserhöhung geringfügig blieb. Dennoch nahm der Zuckergehalt stärker ab, als entsprechend der Mycelgewichtserhöhung zu erwarten gewesen wäre; es ist ja bekannt, daß im Alter die Veratmung des Zuckers stärker hervortritt als die Neubildung von Mycel. Es kann also angenommen werden, daß auch hier autolytische Vorgänge die Mycelgewichtskurve beeinflußten, denn auch in saurer Lösung setzt Autolyse ein. Die verhältnismäßig geringe Mycelgewichtserhöhung läßt sich dann so erklären, daß während des langsamen Wachstums neuen Mycels die Autolyse die älteren Mycelteile schon stark angreift. Gegen den Schluß der Versuchsreihe (70 Tage), wenn das Wachstum neuen Mycels die Reaktion immer weniger beeinflußt, fiel die H-Ionenkonzentration deutlich, weil jetzt die Autolyseprodukte überwogen und die Reaktion des Substrats bestimmten.

Die Unterschiede in der vegetativen Entwicklung der beiden Gruppen, sowie der Einfluß der autolytischen Vorgänge kommen ebenfalls sehr deutlich zum Ausdruck durch einen in Tabelle VII gegebenen Überblick über den ökonomischen Koeffizienten der untersuchten Stämme, d. h. der Menge des auf 100 Teile verbrauchten Zuckers gebildeten Mycels nach verschieden langer Kulturdauer.

Tabelle VII.

Stamm	Ökonomischer Koeffizient nach Kulturtagen				
	7	15	20	30	70
3	27,2	40,8	35,3	35,0	30,8
4	15,4	36,3	37,1	31,7	25,0
5	25,5	23,9	23,0	18,3	12,8
6	7,8	6,8	6,7	6,3	5,6
7	6,1	6,1	6,0	6,2	5,5
8	6,2	6,3	6,3	6,2	5,6
10	4,8	5,0	5,0	5,6	3,8

Es sei noch einmal betont, daß diese charakteristischen Wachstumskurven nur für bestimmte Nährlösungen gelten.

Inhaltsstoffe.

Über die Inhaltsstoffe der Actinomyceten liegen verhältnismäßig wenige Untersuchungen vor. *Rippel* und *Witter* (71) beschäftigten sich eingehend mit den Inhaltsstoffen Volutin, Fett und Chitin. Reserveeiweiß in Form von Volutin fand sich bei den hier besprochenen Formen

in allen Stämmen, jedoch in verschiedenen Medien verschieden häufig. Es wurde außer mit den gebräuchlichen Färbungen und Reaktionen noch nachgewiesen mit der von *Heucke* und *Henneberg* (35) für Hefen angegebenen Lebendfärbung durch eine 0,001 %ige wässerige Neutralrotlösung (die Ergebnisse finden sich in Tabelle VIII).

In Nährbouillon mit 1 %igem Lithiumchloridzusatz, der das Wachstum beeinträchtigt und Fadenverdickungen und Auftreibungen (Involutionsformen) veranlaßt, ließ sich nur bei zwei Stämmen mäßig viel Volutin nachweisen. *Witter* (92) fand bei fünf Strahlenpilzstämmen in synthetischer Nährlösung mit steigendem LiCl-Zusatz abnehmenden Volutingehalt, bei Zusatz von 0,5 % LiCl „fast kein Volutin". In Hefekochsaft war Wachstum und Speicherung des Reservestoffs sehr gut, einige Zerfallsteile waren ganz mit Volutin angefüllt, nach fünfwöchentlicher Kulturdauer ließ es sich immer noch nachweisen. Bei den reichlich sporulierenden Formen fand es sich auch in den Sporen. Die Volutinkugeln sind ungleich groß und in den Fäden ungleichmäßig verteilt, oft lagen sie nicht in der Mitte des Fadens, sondern seitlich. In den beiden Bodenauszügen war das Wachstum kümmerlich, die Hyphen blieben dünn und wuchsen wellenförmig, in alten Kulturen fanden sich Involutionsformen.

Tabelle VIII. Untersuchung auf Volutin.
Temp. 22° C. Ausgangs-p_H 6,8.

Stamm	1			4			5			6			10			12		
Kulturdauer in Tagen	4	12	35	4	12	35	4	12	35	4	12	35	4	12	35	4	12	35
NB.* + 1 % Dextrose	−	++	+	−	+	−	−	+	+	−	+	−	−	+	−	−	+	−
NB. + 1 % LiCl	−	−	−	−	±	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−
NB. + 10 % Saccharose	−	+	−	−	−	−	−	+	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−
NB. + 2,5 % NH_4Cl	−	+	−	−	++	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Hefekochsaft	−	+	+	−	++	+	−	++	+	−	++	+	−	++	±	−	++	±
Bdauszug** 1	−	+	−	−	−	−	−	+	±	−	++	±	−	++	+	−	++	±
Bdauszug*** 2	−	+	−	−	+	±	−	++	+	−	++	±	+	+++	±	+	+++	+

− = kein, ± = gering, + = mäßig, ++ = gut, +++ = reichlich.
* = Nährbouillon.
** = Bodenauszug: 20 g Walderde + 100 ccm aq., 20 Min. bei 120° C sterilisiert, darauf filtriert, am nächsten Tag nochmals sterilisiert.
*** = Bodenauszug: 20 g Walderde + 100 ccm 3 %ige H_2SO_4, geschüttelt, filtriert, mit Na_2CO_3 auf p_H 6,8 gebracht, 20 Min. bei 120° C sterilisiert.

Die Volutineinlagerung aber war teilweise sehr reichlich, in älteren Kulturen ging sie wie bei allen Stämmen zurück zugunsten einer zunehmenden Fettspeicherung.

Der Fettnachweis wurde mikroskopisch durch Färbung mit α-Naphthol und Sudan III und Verseifung mit Alkalien nach *Molisch* (54) geführt. Die meist kugeligen Einschlüsse lagen sowohl in den Fäden, als auch in den Involutionsformen. (Siehe Tabelle IX.)

Tabelle IX. Untersuchung auf Fett.
Alter der Kulturen 29 Tage. Temperatur 22° C. Anfangs-p_H 6,8.

Fetteinlagerung in Stamm	NB. + 1% Glucose	NB. + 1% LiCl	NB. + 2% Dextrin	NB. + 10% Saccharose	Hefekochsaft	Bdausz. 1	Bdausz. 2
1	—	+	—	—	—	+	+
3	—	+	—	—	—	+	+
4	—	+	+	—	—	—	—
5	—	+	—	+	—	+	+
6	—	—	—	—	—	—	—
7	—	—	—	—	—	++	++
8	—	—	+	+	—	+	+
10	++	++	+	+	+	++	++
12	++	++	+	+	+	++	++

NB. = Nährbouillon.
Bdausz. = Bodenauszug. Bezeichnung wie bei Tabelle VII.

Bei Stamm *6* wurde in keiner Nährlösung Fett gefunden, auch nicht in 3 Monate alten Kulturen. Auffällig ist weiterhin das nahezu vollständige Fehlen der Fetteinschlüsse bei den Stämmen *1* bis *8* in Hefekochsaft und in Nährbouillon mit Dextrin und Glucose, während sie in anderem Material häufig und teilweise reichlich Fett ablagerten. Gerade diese Lösungen gestatten die üppigste Entwicklung der Pilze, und Volutineinlagerung ist in ihnen stets reichlich vorhanden. Das Fehlen der Fetteinschlüsse deutet die verschiedenen Faktoren bei der Entstehung beider Inhaltsstoffe an: Volutinbildung stellt die Speicherung eines wichtigen Reservestoffs dar, solange der Organismus noch zu intensivem Wachstum fähig ist. Verfettung aber bedeutet eine Degenerationserscheinung bei abnehmender Lebensintensität.

Allerdings sind die Stämme *10* und *12* von dieser Regel ausgenommen. Es wurde bereits erwähnt, daß beide auf allen Nährböden ein fest zusammenhängendes, hartes und sprödes Mycel bilden, das sich wie eine Wachsschuppe von der Unterlage loslösen ließ. Es enthält schon in frühen Wachstumsstadien reichlich fett- und wachsartige Stoffe, bei ihnen kann also die Ablagerung dieser Stoffe nicht als eine degenerative Verfallserscheinung angesehen werden. Ein Teil der Einlagerungen besteht aus Fett, das sich mit Sudan rötet. Nach Zusatz von Äther werden gewisse Bestandteile herausgelöst, doch werden die Einlagerungen auch nach tagelangem Liegen nicht vollständig gelöst.

Zur Verseifung wurden Mycelteile auf einen Objektträger gebracht, mit einem Deckglas bedeckt und mehrere Tage in der feuchten Kammer der Einwirkung von gleichen Teilen wässeriger konzentrierter Kalilauge und ebensolcher Ammoniaklösung überlassen. Nach 5 Tagen ergab die mikroskopische Untersuchung, daß eine Verseifung des Fettes erfolgt war. Es hatten sich kristallinische Massen und zahlreiche Kristallnadeln der entsprechenden Seifen gebildet.

Will man Glykogen neben Fett- und Wachsstoffen mikroskopisch auffinden, so muß die Jodlösung sehr stark verdünnt sein. Anscheinend kann dieser Reservestoff unter dem Einfluß gewisser ungünstiger Bedingungen in der *Actinomyces*-Zelle abgelagert werden (59), solche Bedingungen scheinen aber im allgemeinen nur selten vorzuliegen. Glykogen konnte bei keinem der Stämme nachgewiesen werden.

Auf Chitin und Cellulose wurden die Stämme *1*, *4*, *5*, *6*, *7*, *8*, *10* und *12* nach der von *van Wisselingh* (42) angegebenen Methode untersucht, wobei der Chitinnachweis durch Erhitzen des Mycels in Glycerin auf 300° verschärft wurde. In allen untersuchten Formen ließ sich weder Chitin noch Cellulose nachweisen, ein Ergebnis, das auch *Rippel* und *Witter* (71) auf mikroskopischen Nachweis hin erhielten.

Verhalten zu Farbstoffen.

Das Verhalten der Strahlenpilze gegenüber den gebräuchlichen Farbstoffen ergab keine Besonderheiten. Lebenskräftiges Mycel und intakte Sporen waren bei der *Gram*schen Färbung noch nach einer Entfärbungszeit von 90 Sekunden grampositiv, ältere Fäden entfärbten sich nach *Gram*, die Sporen hielten den Farbstoff am längsten fest. Dagegen wurde bei Prüfung der vielumstrittenen Säurefestigkeit ein erwähnenswertes Ergebnis erhalten.

2 bis 3 Wochen altes Material wurde wie üblich auf Objektträgern ausgestrichen und nach Lufttrocknung über der Flamme fixiert. Der ganze Objektträger wurde sodann mit konzentriertem Carbolfuchsin übergossen und bis zum Sieden der Farblösung erhitzt. Nach Abspülen mit Wasser erfolgte die Entfärbung durch 5%ige Schwefelsäure oder 1%igen Salzsäure-Alkohol, bis mit bloßem Auge das ganze Präparat entfärbt schien. Sodann gründliches Abspülen mit Wasser. Häufig wurde eine Gegenfarbung mit verdünntem wässerigem Methylenblau gemacht.

Lufthyphen und Sporen der Stämme *1* bis *9* waren nicht gleichmäßig widerstandsfähig gegen die Entfärbung, doch können alle nicht als säurefest bezeichnet werden.

Das ist anders bei den aus Erlenknöllchen isolierten Stämmen. Stamm *10* bis *15* müssen zweifellos als säurefest beiden Entfärbungsverfahren gegenüber gekennzeichnet werden. Für ihre Säurefestigkeit war die Beschaffenheit der gebräuchlichen Nährböden im allgemeinen ohne Einfluß, es erwies sich auch als gleichgültig, ob die Hyphen auf

festem Substrat oder innerhalb einer Lösung gewachsen waren. Allerdings war die Säurefestigkeit in diesem Falle etwas geringer, auch hielten die Fäden den Farbstoff nicht gleichmäßig stark fest, neben tiefroten lagen schwach gefärbte Fadenstücke. Durch Kultivieren auf bestimmten Nährböden (Butter- und Rindertalgagar) wurde die Säurefestigkeit deutlich erhöht.

In der Literatur findet sich eine Reihe von Angaben über einzelne, meist pathogene, säurefeste Actinomyceten [*Fritsche* (27), *Davis* (19)], auch *Lieske* (1921) fand unter seinen 112 Formen 7 Stämme, die sich als säurefest erwiesen, darunter einen aus „Erlenwurzeln kultivierten". Der wichtigste und weitaus bekannteste säurefeste Organismus unter den nahen Verwandten der Actinomyceten ist der *Tuberkelbacillus*. Sein Mycel ist in gleicher Weise mit Fett- und Wachssubstanzen inkrustiert wie das der hier besprochenen säurefesten Strahlenpilze. Es darf daher angenommen werden, daß die Eigenschaft der Säurefestigkeit mit diesen Substanzen zusammenhängt.

Physiologische Einzelheiten.

Die Natur der gebildeten Säure.

Es wurde bereits ausführlich dargelegt (S. 46), daß in bestimmten Nährlösungen ein Teil der Pilze während des Kulturverlaufs die H-Ionenkonzentration des Substrats beträchtlich erhöht. Dieses Säurebildungsvermögen wurde auch auf andere Weise nachgewiesen.

Beim Wachstum auf Natriumsulfit-Lactose-Agar nach *Endo* waren am 4. Tage nach der Impfung (Temperatur 29°) bei Stamm *6* die Kolonien selbst und ihre Umgebung rot gefärbt. Das gleiche Ergebnis trat bei Stamm *7* und *8* ein, doch war die Verfärbung wegen des beigemischten Eigenfarbstoffs nicht so eindeutig. Alle Säurebildner zeigten weiter diese Fähigkeit deutlich auf Plattenkulturen von Fleischextrakt-Pepton-Dextrose-Agar, dem Calciummalat zugesetzt wurde (44). Auf dem undurchsichtigen, weißlich getrübten Nährboden bildete sich um die Kolonien herum eine aufgehellte Zone infolge der Lösung des Kalks durch die vom Pilz erzeugte Säure. Über die Natur der Säure wurden uns keinerlei Angaben aus der Literatur bekannt, doch wies der in den Kulturen auftretende ausgesprochene Geruch nach Milchsäure darauf hin, Untersuchungen in dieser Richtung anzustellen. (Tabelle X.)

Es wurde 1 ccm der filtrierten Kulturflüssigkeit nach Ansäuern mit einigen Tropfen H_2SO_4 mit 10 ccm Äther gründlich ausgeschüttelt und nach Verdampfen des Äthers der Rückstand in 2 ccm Aqua dest. aufgenommen. Zu 0,2 ccm dieses wässerigen Rückstandes wurden 2 ccm konzentrierte H_2SO_4 hinzugefügt und die Lösung nach kräftigem Durchschütteln 2 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Erkalten wurden 2 Tropfen Guajakollösung hinzugefügt (41). Bei Vorhandensein von Milchsäure tritt nach Zusatz des Guajakols Rotfärbung ein. Die Reaktion ist außerordentlich empfindlich, der Ausfall ist bereits bei Bruchteilen von Milligrammen Milchsäure positiv.

Die Kulturflüssigkeiten der Stämme *6*, *7*, *8* und *10* färbten sich tiefrot, sie enthielten also Milchsäure, die von den Pilzen als Zwischenprodukt des Kohlenhydratstoffwechsels gebildet worden war. Die Natur der Säure wurde außerdem noch auf folgende Weise festgestellt (75):

5 ccm filtrierte Kulturlösung wurde mit 25 ccm Äther in einem kleinen Scheidetrichter gut durchgeschüttelt. Bei Vorhandensein von Milchsäure wird diese vom Äther aufgenommen. Nach Abscheiden der Ätherschicht wurde die Lösung abgelassen und zum Äther 5 ccm Aqua dest. hinzugefügt, dem 2 Tropfen einer verdünnten Eisenchloridlösung (1 : 9 Aqua dest.) zugesetzt waren. Nach kräftigem Schütteln färbt sich bei Anwesenheit von Milchsäure das Wasser gelbgrün durch Bildung von milchsaurem Eisen.

Tabelle X. Säurebildung in Fleischextrakt-Pepton-Dextroselösung.

Ausgangs-p_H 5,84.

Stamm	Alter der Kultur	End-p_H	Farbe der Lösung	Milchsäurenachweis
3	25 Tage	8,39	braun	—
4	25 „	8,55	braungelb	—
5	25 „	8,53	braun	—
6	25 „	4,86	dunkelbraun	+
7	25 „	4,74	dunkel braunrot	++
8	25 „	4,83	dunkelbraun	+
10	25 „	5,17	„	++

Die Reaktion fiel, wie Tabelle X zeigt, bei allen vier Stämmen deutlich positiv aus. Endlich wurde die Milchsäure noch durch Auskristallisation des Calciumlactats nach der von *Bernhauer* (8) angegebenen Methode nachgewiesen.

Die Kulturflüssigkeit wurde mit Calciumhydroxyd bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt, aufgekocht, filtriert, ausgewaschen und im Vakuum auf ein Drittel ihres Volumens eingedampft. Nach einigen Tagen Stehens im Eisschrank hatten sich nadelförmige Kristalle von Calciumlactat gebildet.

Anderson, *Peterson* und *Fred* (1) haben als Oxydationsprodukt von Dextrose und Lactose bei *Knöllchenbakterien* Brenztraubensäure nachgewiesen. Da diese mit Milchsäure ein reversibles Oxydationssystem bildet, so wäre es möglich, daß bei ihnen auch Milchsäure entstehen könnte, wie andererseits bei *Actinomyceten* Brenztraubensäure vorkommen dürfte. Auf diese Überlegungen hin wurden an Kulturlösungen der Stämme *6* bis *9* wiederholt auch Untersuchungen auf Brenztraubensäure angestellt, jedoch konnte diese Säure nie nachgewiesen werden.

Die wichtigeren Enzyme.

Die Strahlenpilze können, wie wohl alle Organismen, an natürlichen Standorten und in Kulturen Stoffe abscheiden, die — auch unabhängig von der lebenden Zelle — chemische, für ihr Wachstum bedeutsame, Umsetzungen verursachen (Enzyme im weitesten Sinne). Schon *Jensen* (39) prüfte 1902 mit steriler Butter das Fettspaltungsvermögen von *Actin.*

chromogenes, *Waksman* und *Skinner* (88) beobachteten an einer Reihe von Strahlenpilzen die Fähigkeit Cellulose zu zersetzen, *Chatterjee* (14) stellte bei nahen Verwandten (*Diphtheriebacillus*) Labenzym fest. Die meisten Untersuchungen liegen zur Amylasebildung vor [*Caminiti* (12), *Krainsky*, 1914, *Lieske*, 1921, *Waksman*, 1918 und 1919] und *Näslund* und *Dernby* (58) schlossen aus den Reaktionen von 18 *Actinomyces*-Stämmen sowohl auf extra- als auch auf intracelluläre proteolytische Enzyme. Auch mit den hier beschriebenen Actinomyceten wurden Versuche durchgeführt, um das Vorhandensein der wichtigeren Enzyme nachzuprüfen.

Es sei nur kurz erwähnt, daß keiner der Stämme *Cellulose* zersetzte.

Bei der *Einwirkung auf Gelatine* ist die Acidität für die enzymatische Wirksamkeit von besonders großer Bedeutung. Da die meisten neueren Untersuchungen über peptonisierende Fermente niederer Organismen das Optimum für die Spaltung im neutralen Gebiet angeben (*K. Meyer*, *Moycho*, *Gorbach*), wurde die Reaktion des Nährsubstrats (Nährbouillon + 10% Gelatine) auf ein p_H von genau 7,0 eingestellt. Die Kulturen wuchsen bei Zimmertemperatur, teils im Licht, teils im Dunkeln, denn ältere Autoren (24) fanden bei einzelnen Bakterienarten eine Schädigung der Fermente durch das Tageslicht.

Die Stämme *1* bis *9* sowie Stamm *12* zeigten bald eine starke Wirkung auf den Nährboden. Seine Verflüssigung machte sich in weitem Umkreis um die einzelnen Kolonien herum bemerkbar, woraus die enzymatische Natur der ausgeschiedenen Stoffe hervorging. Nach einer Kulturdauer von 9 Tagen war das Substrat (9 ccm) vollständig verflüssigt. Bei den Stämmen *10*, *13*, *11* und *15* geht die Verflüssigung langsamer. Nach *9* Kulturtagen lagen Einzelkolonien am Grunde einer trichterförmigen Vertiefung, zusammenhängende bildeten eingesunkene Krusten auf dem Substrat. Die Geruchsbildung war bei allen Stämmen sehr stark, ein Unterschied zwischen den im Dunkeln und den im Tageslicht gewachsenen Kulturen war nicht feststellbar. Das End-p_H lag bei allen Kulturen im alkalischen Bereich, eine Farbstoffbildung war nirgends eingetreten.

In den Filtraten der verflüssigten Nährböden verliefen die Biuretreaktion und die Farbreaktion mit *Millons* Reagens negativ, mit Salpetersäure und Essigsäure entstand weder in der Kälte noch in der Wärme ein Niederschlag, dagegen waren die letzten Endprodukte der Eiweißzersetzung, Kohlensäure und Ammoniak, immer vorhanden. Die Enzyme der verflüssigenden Stämme waren also sehr wirksam, es dürfte sich bei ihnen um eine Mischung von Proteasen und Peptidasen handeln.

Zur Prüfung auf *Fettspaltung* wurde folgendermaßen verfahren:

Nach der Methode von *Eijkmann* (23) wurden sterile *Petri*-Schalen mit einer dünnen Schicht von sterilem Rindertalg ausgegossen. Nach seinem Erkalten wurde eine dünne Schicht von gewöhnlichem Nähragar (p_H 6,8) darüber gegossen und mit den Stämmen 10 und 14 beimpft. Ferner wurde zu synthetischem Nähragar (Stammlösung + 1% KNO_3 + 2%

Glycerin) ein Zusatz von 1 % Butter hinzugefügt und kräftig durchgeschüttelt, so daß eine weißliche Emulsion entstand, die in Petrischalen ausgegossen wurde (p_H 7,0). Endlich wurden 1 Teil Vollmilch und 2 Teile der synthetischen Nährlösung ohne Agar gemischt, sterilisiert und nach Beimpfen als hängende Tropfen in der feuchten Kammer bei Zimmertemperatur gehalten. Geimpft wurde mit *Stamm 10, 11* und *12.*

Am 11. und 12. Tage nach der Impfung (Temperatur 22°) trat in allen Platten ein stark ranziger Geruch auf. In den Rindertalgplatten hatte unter den großen, verhältnismäßig tief in die Agarschicht hineingewachsenen Kolonien die Fettschicht eine Veränderung erfahren: sie war trüber und undurchsichtiger geworden, ließ sich leicht von der Glasunterlage entfernen und war etwas feucht und brüchig. Diese Veränderungen beruhen auf der Wirkung eines vom Pilz ausgeschiedenen Enzyms, das Fett war verseift. Das bei der Verseifung entstehende Glycerin wird vom Organismus zuerst aufgezehrt, freie Fettsäuren häufen sich an und verursachen den ranzigen Geruch.

Auf den Butteragarplatten ließ sich bei schwacher Vergrößerung um die Kolonien herum eine schmale getrübte Zone erkennen. Wurden Agarteilchen aus unmittelbarer Nähe der Kolonien unter dem Mikroskop untersucht, so fanden sich kleine Kristalldrusen mit sehr feinen kurzen Nadeln. Weit besser gelang jedoch das Studium der Veränderungen an den Fetttröpfchen mit den Kulturen in den hängenden Tropfen. In unbeimpften Tropfen lagen neben kleinen runden, gut begrenzten, viele große, rundlicheckige Fetttropfen, die durch Zusammenfließen von kleineren entstanden waren. Einige Tage nach der Impfung konnte beobachtet werden, wie die großen, zusammengeflossenen Fetttropfen in kleinere aufgeteilt wurden, die zunächst noch rund waren, dann aber eckig und vielgestaltig und gleichsam zernagt erschienen. Auch im Inneren der Tröpfchen entstanden Korrosionen, und die Umgrenzungen wurden immer unregelmäßiger. Schließlich erschienen feine Kristallnadeln, die zum Teil einzeln, zum Teil in drusenförmigen Häufchen beieinander lagen. Es darf als sicher gelten, daß diese Nadeln Kristalle fettsaurer Salze darstellten.

Das Wachstum war auf Butter- und Rindertalgagar spärlich, das Mycel blieb fein, zeigte aber keine krankhaften Veränderungen, Sporen wurden nie entwickelt. Die Säurefestigkeit des Mycels erfuhr, wie erwähnt, nach Kultur auf den Fettnährböden eine deutliche Erhöhung, was auf eine Verdichtung der Fettschichten des Fadengeflechts hindeutet.

Bevor an die Untersuchung der Stämme in *Milch* herangegangen wurde, schien es nötig, einen Vorversuch auszuführen, um die Ausnutzungsmöglichkeit der Lactose als C-Quelle festzustellen. Die Stämme wurden daher auf Fleischextrakt-Pepton-Agar mit 1 % Lactose geimpft (Tabelle XI).

Tabelle XI.

Alter der Kulturen 28 Tage. Anfangs-p_H 6,8. Temperatur 22° C.

Stamm	Wa.	Form und Farbe der Luftsporen	Geruch	End-p_H
3	2	kugelig, gelb, mäßige Sporenbildung	erdig	7,2
4	2	kugelig, grauweiß, gute Sporenbildung	„	7,3
5	2	kugelig, grauweiß, reichlich Sporenbildung	stark erdig	7,0
6	2	grau, kugelig, mäßige Sporenbildung	erdig	6,5
7	1	kugelig, oval, grau, schwache Sporenbildung	—	6,1
8	1	—	—	6,0
10	1	—	—	6,0

Alle Stämme hatten die Lactose als C-Quelle gut verwertet, wenn auch das Wachstum nicht sehr kräftig ausfiel. Immerhin war jetzt anzunehmen, daß Kulturversuche in Milch zu einem Ergebnis führen würden.

Die Gerinnung der Milch kann einfach hervorgerufen werden durch die reine Säurewirkung nach Vergärung des Milchzuckers. Viele Organismen besitzen aber die Fähigkeit, Milch zu koagulieren, ohne den Milchzucker zu vergären, so daß bei ihnen ein spezifisches Enzym vorliegen muß (34), und *Lieske* gibt ausdrücklich an (1921, S. 157), daß seine durch Strahlenpilze koagulierten Milchkulturen „meist keine saure, sondern neutrale oder alkalische Reaktion" zeigten, so daß also auch bei Actinomyceten ein besonderes Ferment zur Koagulierung der Milch vorhanden sein kann.

Die Milch wurde zu je 5 ccm in Reagensgläser gefüllt und einmal kurze Zeit im Autoklaven auf 120° erhitzt. Sie blieb dabei völlig unverändert, bräunte sich nicht und rahmte hinterher normal auf.

Aus der Tabelle XII geht hervor, daß bei der angegebenen Temperatur (vgl. *Lieske*, 1921, S. 157) kein Stamm die Milch zum Koagulieren gebracht hatte. Die Milch erschien in allen Kulturen peptonisiert, ohne vorher geronnen zu sein. Unter der Rahmschicht befand sich eine homogene durchscheinende graugelbe bis bräunliche Flüssigkeit. Das Wachstum der Actinomyceten verlief in der Milch langsam, eine wahrnehmbare Änderung des Mediums trat erst nach 8 bis 10 Tagen ein [vgl. *Chalmers* (13)]. Das Mycel zeigte teilweise Involutionsformen, im Plasma fanden sich zahlreiche körnige Einschlüsse, die sich als Volutin erwiesen, daneben traten im. Hyphenverlauf kugelige Verdickungen auf, die reichlich Fett enthielten.

Schließlich wurden mehrere Versuche durchgeführt, um aus dem Pilzmycel einen Auszug herzustellen, der eine mit Tyrosin versetzte wässerige Lösung dunkel färbt, der also die *Tyrosinase* enthält, jenes Ferment, dem man die für viele Actinomyceten auf bestimmten Medien so charakteristische Farbänderung zuschreibt.

Nahezu ein Drittel der nach Hunderten zählenden Stämme, die von *Skinner* (77) in den letzten 10 Jahren isoliert wurden, und fast der gleiche Prozentsatz der von *Waksman* beschriebenen, bilden das stickstoffhaltige,

Tabelle XII.

Alter der Kulturen 22 Tage. Temperatur 22° C. Ausgangs-p_H 6,2.

Stamm	Wa.	Luftsporen	End-p_H	Beschaffenheit der Milch
3	3	+	7,2	Nicht koaguliert, Rahmschicht nicht aufgewölbt, nicht blasendurchsetzt, hellgelb. Darunter bräunliche, wässerige Flüssigkeit
4	3	++	7,2	Nicht koaguliert, Rahmschicht wie bei *3*. Unter ihr graugelbe Flüssigkeit
5	3	+++	6,9	Nicht koaguliert, Rahmschicht äußerlich unverändert, Flüssigkeit wie bei *3*
6	2	+	6,5	Nicht koaguliert, Rahmschicht äußerlich unverändert, Flüssigkeit wie bei *3*
7	2	+	6,2	Nicht koaguliert, Rahmschicht wie bei *3*, Flüssigkeit wie bei *4*
8	2	—	6,2	Nicht koaguliert, Rahmschicht wie bei *3*, Flüssigkeit wie bei *3*
10	2	—	6,3	Milch ist äußerlich nicht verändert, nur leicht bräunlich. Normale Rahmschicht, nicht fadenziehend

— = kein, + = mäßig, ++ = gut, +++ = sehr gut.

amorphe, braune bis schwarze Pigment, dem *Beijerinck* (6) den Namen Melanin gab. Es ist im ganzen Organismenreich bei Eiweißabbauvorgängen verbreitet, pflanzliche Tyrosinaselösungen aus Kartoffelknollen, aus Rüben, aus Pilzen bilden es außerhalb der lebenden Substanz, bei Actinomyceten aber ist es bisher nicht gelungen, solche aktiven Lösungen herzustellen.

Raper und *Wormall* (66) gaben die Grenzen der H-Ionenkonzentration, innerhalb derer die Tyrosinase wirksam ist, mit p_H 5 bis 10 an. Das Optimum der Wirksamkeit liegt nach ihnen zwischen p_H 6 bis 8. Auch *Wyss* (93) fand maximale Wirksamkeit bei p_H 6,2. In Anlehnung an die Methode, die *Abderhalden* (nach *Klein*, Handb. d. Pflanzenanalyse III, 1933, S. 977) für *Russula emetica* angab, wurde Mycel von Stamm *6*, der die „Tyrosinasereaktion“ am ausgesprochensten zeigte, 6 Stunden lang bei — 17° gefroren, um es brüchig zu machen und auf diese Weise bei nachfolgendem Verreiben eine bessere Zerreißung der Zellen zu erreichen. Bei der Kleinheit des Materials mußte befürchtet werden, daß ohne dieses Brüchigmachen die Zellen einer mechanischen Zerreibung widerstehen würden, so daß das intracellulare Enzym nicht aus den Zellen herausgelöst würde. Nach dem Einfrieren wurde das Mycel mit sehr feinem Sand und Glycerin gründlich verrieben, 24 Stunden bei 22° C stehengelassen und dann abgenutscht. Das Filtrat wurde einer 0,1 %igen wässerigen Tyrosinlösung vom p_H 6,81 zugesetzt und mehrere Tage bei Brutschranktemperatur gehalten.

Beim Vorhandensein von wirksamer Tyrosinase mußte die klare Lösung orangegelb bis braunschwarz verfärbt werden, entsprechend der Menge und Aktivität des vorhandenen Ferments. Die Testlösung

zeigte einen hellgraubraunen Farbton, der eine sichere Entscheidung über den positiven Ausfall des Versuchs nicht gestattete.

Bei einer zweiten Versuchsreihe wurden dem Mycelauszug Katalysatoren zugesetzt, um eine eventuelle Tyrosinasewirkung zu beschleunigen. Nach *Rona* (72) dienten als Katalysatoren Ferrosulfat, Mangansulfat und Wasserstoffsuperoxyd. Außerdem wurde Chloroform benutzt, das von *Stapp* (79) beim Tyrosinasenachweis von *Knöllchenbakterien* verwendet wurde. (Methode zur Gewinnung des Mycelauszugs und Zusammensetzung der Testlösung wie oben angegeben.)

Die Testlösung zeigte die gleiche Verfärbung wie die der ersten Versuchsreihe, das Vorhandensein der Tyrosinase konnte also nicht nachgewiesen werden.

Worauf das Mißlingen dieser Versuche zurückzuführen ist, kann nicht entschieden werden. Nach dem Stand der Untersuchungen nimmt man heute an, daß beim Ablauf der Tyrosin-Melaninreaktion von der Ausgangssubstanz bis zur Entstehung eines Zwischenproduktes, *Rapers* (65) „roter Substanz", zwei Fermente wirksam sind und daß die weiteren Stadien der Reaktion dann ohne Fermentwirkung ablaufen. Es wäre möglich, daß bei der Herstellung aktiver Lösungen die Art des Abtötens der Mycelzellen von wesentlicher Bedeutung ist für die Erhaltung der Enzymaktivität und daß durch das lange Einfrieren des Mycels eines dieser Fermente eine Schädigung erlitten hätte, so daß hierin der Grund für das Mißlingen der Versuche läge.

Farbstoffbildung.

Die Farbstoffbildung war während der Untersuchungszeit auf den gleichen Nährböden und unter sonst gleichen Verhältnissen konstant.

Alle Stämme scheiden Pigmente in das umgebende Nährsubstrat aus, ohne meist selbst gefärbt zu sein. Die Ausscheidung eines braunschwarzen Farbstoffs bei Stamm *6* auf allen, organische Stickstoffverbindungen enthaltenden Medien wurde bereits erwähnt. Stamm *7* bildet ebenfalls tiefdunkles Pigment, doch geht sein Ton mehr ins Braunrote. Bei allen anderen Stämmen erreicht der ausgeschiedene Farbstoff nicht die gleiche Intensität (Tabelle I). Auch die Art der C-Quelle ist nicht ohne Bedeutung: die Zuckerarten sind der Pigmentausscheidung nicht sehr förderlich, gute Farbstoffentwicklung tritt mit Dextrin auf, die intensivste Färbung war in den meisten Fällen mit Glycerin als C-Quelle zu beobachten. In synthetischen Nährlösungen (Stammlösung + 2% Glycerin) findet Pigmentbildung ebenfalls statt, sofern stickstoffhaltige organische Verbindungen zugesetzt werden, doch ist ihre Eignung auch nicht gleichwertig. Asparagin z. B. beeinträchtigt die Pigmentbildung, was schon von *Krainsky* (47) beobachtet wurde. Sehr stark behindert wird die Farbstoffbildung durch anorganische N-Quellen, auch wenn diese ein gutes Wachstum ermöglichen. Diese Erscheinung ist besonders auffallend bei Stamm *6*

(Tabelle VI). Die Stämme *8* und *9* scheiden auf den erwähnten Medien ebenfalls mehr oder weniger intensiven Farbstoff aus, doch besitzen sie auch eine hellgelbe Eigenfarbe. An solchen Stämmen machte *Krainsky* die Beobachtung, daß diese Eigenfarbe mit sehr kleinen Asparagindosen am besten zur Entfaltung kam. Bei Zusatz von 0,02 % Asparagin erhielt er schon am 5. Kulturtag intensiv gefärbtes Mycel.

Zur Entscheidung über die Eigenfarbe der beiden Stämme wurden diese daher auf einen Agarnährboden geimpft, der „Stammlösung" + 1 % Dextrose und 0,02 % Asparagin enthielt. Gleichzeitig sollte geprüft werden, ob die Intensität der Pigmentbildung beim Zutritt des Tageslichts verändert würde gegenüber der Kultur unter Lichtabschluß.

Tabelle XIII.

Alter der Kulturen 8 Tage. Ausgangs-p_H 6,8.

Stamm	Wachstum im Licht und im Dunkeln	Farbe des Mycels		Farbe des Agars	
		belichtet	unbelichtet	belichtet	unbelichtet
8	2	tiefgelb	hellgelb	hellgelb	gelb
9	3	„	gelb	„	„

Die Zusammenstellung in Tabelle XIII zeigt, daß das Wachstum der beiden Stämme unter Lichtabschluß genau so kräftig ausfiel wie bei Lichtzutritt. Die Intensität der Eigenfarbe wurde auf dem stickstoffarmen Nährboden erhöht, doch änderte sich nur der Farbton. Ob das Tageslicht einen Einfluß ausübte, ließ sich nach dem Ausfall der Kulturen nicht entscheiden.

Durch eine andere Kulturreihe wurde versucht, hierüber Aufschluß zu erhalten. Die Kulturen wuchsen bei Zimmertemperatur in Stammlösung + 2 % Glycerin + 0,1 % Tyrosin. Ausgangs-p_H 6,8. Die belichteten standen vor einem Nordfenster, waren also direktem Sonnenlicht nicht ausgesetzt (Tabelle XIV).

Auch diese Zusammenstellung läßt keinen merklichen Einfluß des Lichts auf die Farbstoffbildung erkennen. Das Auftreten einer Färbung erfolgte in Tageslichtkulturen nicht einheitlich früher als in unbelichteten. Bei Stamm *4*, *11*, *12* trat der Farbstoff im Licht früher, bei Stamm *7*, *8*, *13*, *14* gleichzeitig auf, bei Stamm *3*, *5*, *6*, *10* war die Tönung am 5. Kulturtage bei unbelichteten Kulturen sogar tiefer als bei belichteten. Beim Abschluß der Versuchsreihe wiesen einige Tageslichtkulturen eine tiefere, andere die gleiche Tönung auf wie die unbelichteten, während noch andere im Dunkeln einen tieferen Farbton angenommen hatten als die gleichaltrigen Tageslichtkulturen.

Ein ähnliches Ergebnis erhielt *Doebelt* (20) bei Untersuchungen an *Penicillium africanum*, während *Danilow* (18), der die Einwirkung

Tabelle XIV. Farbstoffbildung.

Alter der Kulturen	5 Tage		14 Tage		21 Tage		30 Tage	
Stamm	Tageslicht	Dunkelzimmer	Tageslicht	Dunkelzimmer	Tageslicht	Dunkelzimmer	Tageslicht	Dunkelzimmer
3	schw. gelblich	schw. gelb	schw. braun	gelb	braungelb	gelb	braungelb	gelb
4	„ „	farblos	„ gelb	farblos	schw. gelb	schw. gelb	schw. gelb	schw. braun
5	„ „	gelb	„ braun	gelbbraun	braun	braun	braun	dunkelbraun
6	„ „	„	dunkelgelb	graubraun	dunkelgelb	graubraun	braunschwarz	braunschwarz
7	fleischfarben	fleischfarben	schw. rot	gelb	rötlich	braunrot	rötlich	braun
8	„	„	gelbbraun	dunkelgelb	braun	„	braun	„
9	„	schw. gelb	schw. gelb	schw. gelb	gelb	gelb	gelbrot	braunrot
10	schw. gelblich	rötlich	„ „	„ rotbraun	gelbrot	rot	rötlich	„
11	„ „	farblos	fleischfarben	„ „	„	„	„	„
12	fleischfarben	„	„	„ „	fleischfarben	„	braunrot	„
13	„	fleischfarben	„	„ „	rötlich	„	„	„
14	„	„	„	„ „	bräunlich	braun	braun	„

der Sonnenstrahlen bestimmter Wellenlänge prüfte, seine Untersuchungen dahin zusammenfaßte, daß bei *Isaria virescens* unter vollkommenem Lichtabschluß keinerlei Pigment, im Tageslicht dagegen ein orangeroter Farbstoff gebildet wurde. Auch *Ebeling* (22) beobachtete an *Penicillium funicolusum Thom* bei unbelichteten Kulturen eine Verzögerung und nach längerem Kultivieren im Dunkelzimmer sogar ein vollständiges Ausbleiben der Pigmentbildung. Er schreibt dem Licht einen starken Einfluß auf die Pigmentbildung zu. Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen diese Erfahrung nicht als All gemeinerscheinung; jedenfalls dürften verschiedene Versuchsobjekte sich unter ähnlichen Kulturbedingungen gegenüber der Einwirkung des Tageslichts recht abweichend voneinander verhalten.

Einen merklichen Einfluß auf das Auftreten und die Intensität der Farbstoffbildung hat dagegen die Reaktion der Nährlösung.

Um ihre Einwirkung zu prüfen, wurde die gleiche Nährlösung benutzt (Stammlösung + 2% Glycerin, + 0,1% Tyrosin). Die Kulturen standen im Dunkelzimmer, das p_H wurde mit NaOH nach der Sterilisation eingestellt, da die H-Ionenkonzentration, wie schon von *Foster* und *Randall* (25) eingehend besprochen, sich in den meisten Fällen während des Sterilisierens ändert.

Tabelle XV. Wirkung der Reaktion der Nährlösung auf die Pigmentbildung.

Alter der Kulturen 11 Tage. Temperatur 22° C.

Stamm	Ausgangs-p_H	Wa.	Farbe der Lösung	Ausgangs-p_H	Wa	Farbe der Lösung
1	6,7	3	braungelb	8,5	3	dunkel rotbraun
2	6.7	3	„	8,5	3	„ „
3	6,2	2	schwach gelb	8,2	3	mittelbraun
4	6,2	2	„	8,2	3	gelb
5	6,2	2	gelb	8,2	3	braunschwarz
6	6,2	2	„	8,2	3	„
7	6,2	2	„	8 2	3	braunrot
8	6,2	2	„	8,2	2	„
10	6,2	2	„	8,2	3	„

Bezeichnungen wie bei Tabelle I.

Aus der Tabelle XV geht deutlich hervor, daß der Farbton in allen Fällen in dem alkalischen Medium schon am 11. Kulturtage beträchtlich tiefer war als in dem schwach sauren. Die Färbung trat in der alkalischen Lösung auch früher auf. Bei Stamm *5*, der am schnellsten wächst, war die Lösung vom p_H 8,2 schon am 4. Tage nach der Impfung dunkelrot gefärbt, während sie in der Kultur vom p_H 6,2 noch völlig farblos erschien. Am 6. Tage nach der Impfung zeigten alle Lösungen vom p_H 8,2 die beginnende Verfärbung, während diejenigen vom p_H 6,2 noch ungefärbt waren.

Zur näheren Orientierung über die in die Lösungen ausgeschiedenen Farbstoffe wurden die Kulturflüssigkeiten organismenfrei filtriert und darauf mit einer Reihe von Lösungsmitteln kräftig ausgeschüttelt. Dabei zeigte es sich, daß aus den Nährlösungen der Stämme *1*, *2*, *3* und *7* durch einige bzw. alle angewandten Lösungsmittel sich ein gelber Farbstoff ausschütteln ließ. Die gefärbten Substanzen der übrigen Lösungen waren nicht in den Lösungsmitteln aufnehmbar (Tabelle XVI).

Tabelle XVI. Extraktion der Farbstoffe.

Lösungsmittel	Stamm *1*	Stamm *2*	Stamm *3*	Stamm *4*	Stamm *5*	Stamm *6*	Stamm *7*	Stamm *8*	Stamm *10*
Alkohol	+	—	+	—	—	—	—	—	—
Äther	+	+	+	—	—	—	+	—	—
Chloroform ..	+	—	+	—	—	—	+	—	—
Benzol	+	+	+	—	—	—	+	—	—
Xylol	+	+	+	—	—	—	—	—	—
Schwefelkohlenstoff	+	+	+	—	—	—	—	—	—
Tetrachlorkohlenstoff	+	+	+	—	—	—	—	—	—

+ löst sich, — = löst sich nicht.

Die Kulturflüssigkeiten der Stämme *1*, *2*, *3* und *7* wurden auch nach mehrmaligem Ausschütteln nicht vollständig entfärbt. Bei den drei ersten blieb eine braungelbe, bei Stamm *7* eine dunkle, braunrote Substanz zurück, die sich nicht extrahieren ließ. Alle vier Farbstoffe waren in den Lösungsmitteln von intensiv gelber Farbe. Auf dem Wasserbad eingedampft, erwiesen sie sich als hitzebeständig, der Verdampfungsrückstand war bei allen in Wasser mit gelber Farbe löslich. Wurde die Farblösung angesäuert, so blieb die gelbe Farbe bestehen. Beim vorsichtigen Eindampfen der sauren Farbstofflösung von Stamm *7* fielen lange, nadelförmige Kristalle aus. Wird die wässerige Lösung der Farbstoffe der drei ersten Stämme mit Alkali versetzt, so erfolgt kein Farbumschlag. Macht man dagegen die wässerige Farbstofflösung von Stamm *7* alkalisch, so schlägt die gelbe Farbe in einen schön violetten Farbton um. Dieser violette Farbstoff löst sich nicht in Chloroform und nicht in Äther.

Die filtrierten Kulturflüssigkeiten wurden weiter geprüft auf eine Verschiebung ihres Farbtons. Zu diesem Zwecke wurden sie in der Kälte mit verdünnter und konzentrierter Schwefelsäure, Salzsäure, Salpetersäure und Essigsäure versetzt und mit diesen Säuren auch zum Kochen erhitzt. Ebenso wurden Natrium-Kalium- und Ammoniumhydroxyd in der Kälte zugesetzt und die Lösungen mit ihnen gekocht. Bei keiner Lösung trat nach Behandlung mit verdünnter oder konzentrierter Säure eine Verschiebung des Farbtons in der Kälte ein. Ebensowenig konnte der Farbton in der Kälte oder beim Kochen verschoben werden durch die genannten Basen. Mit Ausnahme der konzentrierten Salpetersäure und der konzentrierten Schwefelsäure vermochten auch die konzentrierten Säuren beim Kochen auf den Farbton keinen Einfluß auszuüben. Beim Kochen mit konzentrierter Salpetersäure hellte sich der Farbton aller Kulturflüssigkeiten auf und nahm einen gelblichgrünen Ton an, während gleichzeitig reichlich NO_2-Dämpfe entwichen. Beim Kochen mit konzentrierter Schwefelsäure nahm der Farbton aller Lösungen eine dunklere Nuance an, die auch nach dem Erkalten nicht verschwand.

Ein Pilzfarbstoff von den gleichen Eigenschaften wie der des Stammes *7* wurde von *Bortels* (10) aus der Nährlösung von *Aspergillus niger* isoliert. Er fand ihn begleitet von braunroten Substanzen, aus denen mit Salzsäure voluminöse braunschwarze Massen ausgeflockt werden konnten, die aus nichts anderem bestanden, als aus „jenen noch nicht näher bekannten Stoffen, die man Humussäuren nennt". Es fanden sich also bei *Aspergillus* neben dem Farbstoff huminartige Verbindungen und das Auftreten beider Bestandteile stand nach den Versuchen von *Bortels* in gewissen Beziehungen zur Autolyse.

Bei *Actinomyceten* liegen anscheinend ganz analoge Verhältnisse vor. Aus alten, infolge von autolytischen Vorgängen alkalisch gewordenen Lösungen verschiedener Zusammensetzung fallen beim Ansäuern reichlich braune, mehr oder weniger derbe Flocken aus.

Tabelle XVII. Bildung von Huminsubstanzen.

Stamm	Alter der Kulturen	Anfangs-p_H	End-p_H	Brauner Niederschlag nach Ansäuern
3	40 Tage	6,8	7,2	+
4	40 „	6,8	7,9	—
5	40 „	6,8	8,3	++
6	40 „	6,8	8,0	++
7	40 „	6,8	7,2	++
8	40 „	6,8	7,3	+
10	40 „	6,8	8,0	+

Die in der Tabelle XVII zusammengefaßten Ergebnisse wurden erhalten aus Kulturen in „Stammlösung“ + 2 % Glycerin + 1,3 % Asparagin.

Die gleiche Ausflockung wird erhalten aus alten Kulturen in Fleischextrakt-Peptonlösung mit 1 % Dextrose. So konnten bei den Stämmen *3* und *7* in tief dunkelbraunen, 105 Tage alten Kulturen dieser Zusammensetzung solche Niederschläge reichlich beobachtet werden, während sie aus Lösungen jüngerer, 29 Tage alten Kulturen unter sonst gleichen Verhältnissen nicht zu erzielen waren. Es liegt also auch bei Actinomyceten ein Gemenge der Farbstoffe mit Huminen vor, das je nach dem Humingehalt und der Reaktion der Lösung gelb bis dunkelbraun aussieht. In Lösungen mit verhältnismäßig hoher H-Ionenkonzentration ist die Färbung schwach und wird fast nur hervorgerufen durch gelbe bis braungelbe Humine, in alkalischen Lösungen dagegen treten tief dunkle Farbtönungen auf, sie enthalten neben Huminen reichlich den unzersetzten Farbstoff. Möglicherweise erfolgt die Bildung der Farbstoffe analog der der Humine im Verlauf der Eiweißspaltung infolge der Autolyse unter Kondensation und gleichzeitiger Oxydation der beim Eiweißabbau entstehenden cyclischen Stoffe. So könnte, wie *Rippel* (69) bereits betonte, die teilweise Erforschung der Huminstoffe vielleicht ermöglicht werden über die die Humine begleitenden Farbstoffe.

Aus dem Vorstehenden geht die große Bedeutung der Actinomyceten für die Humusbildung hervor, insbesondere wenn man sich den Anteil der Strahlenpilze an der gesamten Pilzmikroflora des Bodens vergegenwärtigt. *Waksman* und *Curtis* (87) fanden in drei amerikanischen Böden verschiedener Herkunft unter allen untersuchten Pilzen in einer Tiefe von 20 inches (= 51 cm) im Jahresdurchschnitt einen Actinomycetenanteil von 48,7 %, in einer Tiefe von 76 cm sogar einen solchen von 65,6 %. Als ganz besonders wichtig muß für halbtrockene Böden der Beitrag der Strahlenpilze zur Entstehung der Humussubstanzen bezeichnet werden, weil sie in diesen relativ viel reichlicher vorkommen als in ausgesprochen feuchten, da der Anteil der Bakterien in trockneren Böden sehr schnell zurückgeht.

Die Versuche im ultravioletten Licht.

Die Untersuchungen im ultravioletten Licht stehen insofern mit den soeben beschriebenen in engem Zusammenhang, als an ihnen ebenfalls die Wirkung auf die Pigmentausscheidung der Pilze beobachtet wurde. Außerdem aber sollten sie Aufschluß darüber geben, von welcher Art die Einwirkung der ultravioletten Strahlen auf die morphologische Entwicklung der Actinomyceten war.

Bei den Versuchen zur Beobachtung der Pigmentbildung wurden Kulturkolben aus Quarzglas verwendet von der Form und Größe der 100-ccm-Erlenmeyerkolben. Die Versuche zur Feststellung der Wirkung auf Mycel- und Sporenbildung wurden in Petrischalen von gewöhnlichem Jenaer Glas angesetzt, die während der Bestrahlung unverschlossen blieben.

Als Lichtquelle diente eine Quecksilberquarzlampe „Alpina A 150" der Quecksilbergesellschaft m. b. H. in Hanau. Die stabförmige Lampe ist für Laboratoriumsversuche sehr geeignet, da sie an einem Gestell montiert und in horizontaler und vertikaler Lage benutzt werden kann. Die wichtigeren Linien ihres Spektrums, die gewöhnliches Glas durchdringen, sind: 578 (gelb), 546, 492 (grün), 334 (blau), 405, 408 (violett) mμ. Die biologisch wirksamen Linien des Alpina-Spektrums, die nur Quarzglas durchdringen, sind: 297, 280, 270, 265, 254, 248 mμ. Es kam also bei den Untersuchungen mit der Lampe der Einfluß eines größeren Ausschnitts des Ultraviolettspektrums zur Wirkung, in dem monochromatische Wellen liegen, die nach den Mitteilungen vieler Autoren auf Mikroorganismen maximale bakterizide Wirkung ausüben. So fanden *Coblentz* und *Fulton* (16) für verschiedene Bakterien die größte bakterizide Wirkung zwischen λ 170 bis 280 mμ. *Gates* (29) beobachtete an *Staphylococcus aureus* und *B. coli* eine maximale keimtötende Beeinflussung bei λ 260 bis 270 mμ. *Kreßling* und *Stern* (46) machten ihre Versuche an *Aspergillus niger* mit einer Quecksilberquarzlampe, deren Wellenbereich ebenfalls in den der Alpinalampe hineinreichte, und *Scheitz* (74) arbeitete mit einer Ultraviolettglühlampe und einer Quecksilberquarzlampe, die Strahlen von 5000 bis 254 mμ Wellenlänge aussandten. Bei unveränderter Spannung kann die Strahlungsintensität der Alpinalampe als konstant bezeichnet werden. Ihre Wärmewirkung ist gering, so daß sich das Einschalten von Kühlküvetten erübrigte. Lichtfilter wurden nicht benutzt.

In der Literatur finden sich Angaben, nach denen ultraviolette Strahlen bei gewisser Dosierung eine stimulierende Wirkung auf Mikroorganismen, darunter auch *Schimmelpilze*, auszuüben vermögen. *Nadson* und *Philippow* (56) haben an Schimmelpilzen nach Behandlung mit ultravioletten Strahlen Zonen besseren Wachstums und erhöhter sexueller und geschlechtsloser Vermehrung beobachtet. Weit zahlreicher sind jedoch die Mitteilungen über eine entwicklungshemmende Wirkung ultravioletter Strahlen, die, abhängig von der Zeit und der Intensität der Einstrahlung, entweder so weitgehend sein kann, daß die Organismen abgetötet werden, oder die sich beschränkt auf Veränderungen der inneren Struktur der Zelle und auf Änderungen im Reaktionsausfall der Proteine. So beobachteten *Curran* und *Evans* (17) an Bakteriensporen, daß diese durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht, besonders dem der *Schumann*-Region, hitzeempfindlicher wurden.

Über die Wirkung des ultravioletten Lichts auf Actinomyceten wurden uns keine Untersuchungen bekannt. Zu diesen Versuchen

wurde Stamm *3* herangezogen, weil er sich während der ganzen Beobachtungszeit als sehr kräftig und widerstandsfähig erwiesen hatte und einer der besten Sporenbildner war. Eine Platinöse Sporen wurde in 9 ccm flüssig gemachten Fleischextrakt-Peptonagar mit 2% Glycerin geimpft, Verdünnungen von 1 : 10000 hergestellt und diese in Petrischalen ausgegossen. Die Agarschicht hatte eine Dicke von 0,3 bis 0,4 cm. Von den Schalen wurden zwei Kontrollplatten 1 Stunde lang im gleichen Raum, in dem die Bestrahlung erfolgte, unbedeckt stehengelassen, während je zwei Platten 1, 2 und 4 Stunden unverschlossen der Einstrahlung der Quecksilberlampe ausgesetzt wurden. Die Schalen standen in 24 cm Entfernung unter der waagerecht montierten,stabförmigen Lichtquelle und dieser parallel in zwei Reihen, so daß auf die der Lichtquelle zugewandte Schalenhälfte jeder Petrischale die Strahlen senkrecht, oder doch nahezu senkrecht auffielen, auf die der Lichtquelle abgewandte Schalenhälfte jedoch in einem äußersten Einfallswinkel von 20° 33′ (Durchmesser der Petrischale = 9 cm). Die Platten wurden nach der Bestrahlung bei 22° C im Dunkelzimmer gehalten und nach 4 Tagen untersucht. Die angegebenen Zahlen sind die Mittelwerte aus den Parallelkulturen.

Auf den unbestrahlten Platten waren 43 Kolonien/qcm gewachsen.

In den eine Stunde lang bestrahlten Platten waren auf der der Lichtquelle zugewandten Hälfte der Agarschicht 11 Kolonien gewachsen. Dieses Ergebnis läßt die außerordentlich hohe keimtötende Wirkung der senkrecht auffallenden ultravioletten Strahlen erkennen, rund 99% der Sporen wurden abgetötet. Auf der der Lampe abgewandten Schalenhälfte war am Schalenrande eine sichelförmige Kolonienzone gewachsen, die an der Stelle ihrer größten Breite 1,2 cm breit war. Hier waren 39 Kolonien/qcm gewachsen. Diese Zone verschmälerte sich rasch nach beiden Seiten, sie war ganz verschwunden, bevor sie den der Lampe parallelen Schalendurchmesser erreicht hatte. Auf dem übrigen Teil der schräg bestrahlten Schalenhälfte waren noch 21 Kolonien gewachsen.

Auf den 2 Stunden bestrahlten Platten hatten sich auf der senkrechtbestrahlten Schalenhälfte noch zwei Kolonien entwickelt. Die senkrecht auffallenden Strahlen waren in der zweiten Stunde also nicht von gleich starker bakterizider Wirkung wie in der ersten, ein Ergebnis, das auch von *Scheitz* (74) gefunden wurde. Es waren nur rund 82% der nach einstündiger Einstrahlung noch lebensfähigen Sporen abgetötet worden. Auf der schräg bestrahlten Hälfte war die sichelförmige Zone wieder gewachsen, doch betrug die Stelle ihrer größten Breite nur mehr 0,9 cm und die Flügel verschmälerten sich rascher. Immerhin wuchsen an der breitesten Stelle noch 29 Kolonien/qcm. Auf dem übrigen Teil der schräg bestrahlten Schalenhälfte hatten sich noch fünf Kolonien entwickelt.

Auf den 4 Stunden lang bestrahlten Platten waren keine Kolonien mehr gewachsen.

Um dieses zunächst erstaunliche Ergebnis zu erklären, muß man sich vergegenwärtigen, daß eine Reihe von Faktoren zusammenwirkten, um die bakterizide Kraft der schräg auffallenden Strahlen in verhältnismäßig hohem Grade herabzusetzen. Zunächst kommt die größere Wegstrecke in Betracht, die die Strahlen zu durchlaufen hatten, um den äußeren Schalenrand zu erreichen. Die Wegstrecke: Lichtquelle—äußerer Schalenrand (= LS.) beträgt 26,84 cm. Mit der größeren Wegstrecke sinkt die Intensität der Strahlen umgekehrt proportional dem Quadrat der Entfernung. Wird die Bestrahlungsintensität (I) in 24 cm Entfernung gleich 1 angenommen, so ergibt sich für LS. eine Bestrahlungsintensität (I_1) von: $I_1 = \frac{I \cdot \cos \alpha}{LS^2}$ (α = der vom senkrechten und schrägen Lichtstrahl eingeschlossene Winkel). Ferner wirkt der veränderte Einfallswinkel der Strahlen intensitätsschwächend. Während dieser auf der der Lampe zugewandten Schalenhälfte gleich Null bzw. von Null nur wenig abweichend ist, beträgt er an der von ihr am weitesten entfernten Schalenrandstelle 20° 33'. Endlich muß berücksichtigt werden, daß die schräg einfallenden Strahlen, bevor sie die in der Agarschicht bzw. die an ihrem Grunde liegenden Sporen treffen, eine dickere Agarschicht zu durchdringen haben als die senkrecht auffallenden, wenn auch der Brechungswinkel im Agar, als dem dichteren Medium, kleiner ist als der Einfallswinkel der Strahlen in Luft. Wenn wir auch über die Absorptionsfähigkeit des Agars den ultravioletten Strahlen gegenüber nichts wissen, so ist doch anzunehmen, daß Strahlen absorbiert werden und daß eine dickere Schicht stärker absorbiert als eine weniger dicke, und möglicherweise könnte hier der wichtigste Faktor der Schwächung der bakteriziden Kraft liegen. Leider fehlen in der Literatur Mitteilungen darüber, wie sehr und durch welche Medien am wirkungsvollsten ultraviolette Strahlen zurückgehalten werden.

Im allgemeinen geht aus den Versuchen die keimtötende Wirkung der ultravioletten Strahlen auf die sonst recht widerstandsfähigen Actinomycessporen unmißverständlich hervor. Die Lebenskraft der widerstehenden Sporen wird außerdem durch die Bestrahlung stark geschwächt, denn schon nach einstündiger Einstrahlung waren nur wenige Kolonien fähig, die Agarschicht zu durchbrechen und Luftsporen zu bilden. Das Mycel besteht aus zahlreichen kurzen, verdickten Zellen, neben feinfädigen, sehr dünnen Hyphen. Eine Farbstoffentwicklung wurde in diesen Fällen nie beobachtet.

Die Versuche zeigten aber besonders klar, wie wenig derartige Laboratoriumsversuche imstande sind, die Wirkung der parallel auffallenden Sonnenstrahlen bei zahllos veränderten Einfallswinkeln, den Faktor des wechselnden Feuchtigkeitsgrades, der ungleichen Temperatur, des verschiedenen Bodeneinflusses, der unbekannten Absorptionsverhältnisse, kurz der ganzen Mannigfaltigkeit der natürlichen Lebensverhältnisse in Rechnung zu stellen oder gar nachzuahmen und welche

Vorsicht notwendig ist, Ergebnisse solcher Versuche auf die Gegebenheiten in der Natur zu übertragen.

Es bleiben noch die Ergebnisse zu besprechen, die in bezug auf die Farbstoffbildung bei Behandlung im ultravioletten Licht erhalten wurden.

Während die im Dunkelzimmer und die im Tageslicht gewachsenen Parallelkulturen keinen merklichen Einfluß des Lichts auf die Pigmentbildung erkennen ließen, war an den mit ultravioletten Strahlen behandelten Versuchsreihen sehr wohl eine Beeinflussung durch die Bestrahlung festzustellen. Die Versuchskulturen („Stammlösung“ + 2 % Glycerin, + 0,1 % Tyrosin) wurden täglich 5 Minuten lang in 24 cm Entfernung von der waagerechten, stabförmigen Lichtquelle den ultravioletten Strahlen ausgesetzt, wobei durch regelmäßige Drehung der Quarzkolben dafür gesorgt wurde, daß alle Teile der Lösung gleichmäßig von den senkrecht auffallenden Strahlen getroffen wurden. Die bestrahlten wuchsen mit den unbestrahlten Vergleichskulturen im Dunkelzimmer bei 22° C. Die Ergebnisse finden sich in Tab. XVIII.

Es ist deutlich zu erkennen, daß bei allen Stämmen die Farbstoffbildung bei den Ultraviolettkulturen früher einsetzte und zu tieferen Nuancen führte als bei den nicht bestrahlten. Die Unterschiede in den Farbtönen

Tabelle XVIII. Farbstoffbildung im ultravioletten Licht.

Alter der Kulturen	5 Tage		14 Tage		21 Tage		30 Tage	
Stamm	unbestrahlt	bestrahlt	unbestrahlt	bestrahlt	unbestrahlt	bestrahlt	unbestrahlt	bestrahlt
3	schw. gelb	schw. gelb	gelb	gelbbraun	gelb	braun	gelb	braun
4	farblos	„ rötlich	farblos	schw. gelb	schw. braun	„	schw. gelb	„
5	gelb	gelbbraun	gelbbraun	gelbbraun	braunrot	„	braun	dunkelbraun
7	schw. gelb	gelb	„	gelb	„	braunrot	dunkelbraun	„
8	„ „	schw. gelb	schw. gelb	schw. gelb	gelb	„	„	braun
9	„ „	„ „	„ „	rot	rot	bräunlich	gelb	„
10	„ rot	rot	rot	„	„	tiefrot	braunrot	dunkelbraunrot
11	farblos	rötlich	schw. rot	schw. braunrot	schw. braunrot	„	„	„
12	„	„	„ braunrot	„ „	„ „	braunrot	„	braunrot
13	rötlich	„	„ „	„ „	„ „	„	„	„
14	„	„	„ „	„ „	braungelb	braungelb	„	„

traten schon früh sehr deutlich hervor, verwischten sich später etwas, waren aber gegen Ende des Versuchs wieder sehr deutlich zu erkennen. In den meisten Fällen ging die Skala von rötlichen bis ausgesprochen roten Tönen in dunkelrotbraune bis dunkelbraune über. Ferner fiel auf, daß die Sporenbildung in den bestrahlten Kulturen verzögert eintrat und daß die Sporen — sofern sie überhaupt entstanden — in geringerer Menge vorhanden waren als in den nicht bestrahlten, wie die Übersicht in Tabelle XIX zeigt. Dieses Ergebnis stimmt ganz mit dem von *Ebeling* (29) berichteten überein, auch

Tabelle XIX. Sporenbildung im ultravioletten Licht.
Alter der Kulturen 30 Tage. Temperatur 22° C.

Stamm	Sporenbildung unbestrahlt	Sporenbildung bestrahlt
3	Zusammenhängende Decke	Wenige Sporenhäufchen
4	„ „	„ „
5	„ „	Decke nicht zusammenhängend
7	Wenige Sporenhäufchen	Wenige Sporenhäufchen
8	Reichlich Sporen	Keine Sporen
9	Zusammenhängende Decke	„ „
10	Keine Sporen	„ „
11	„ „	„ „
12	„ „	„ „
13	„ „	„ „
14	Reichlich Sporen	Wenige Sporenhäufchen

Baker (3) kam bei Versuchen mit zwei säurefesten Bakterien zu ähnlichen Feststellungen.

Bei der mikroskopischen Untersuchung des Mycels wurden verhältnismäßig wenige morphologische Veränderungen gefunden. Die Hyphen blieben zwar fein, zeigten aber nicht allzuviele Involutionsformen. Eine Ausnahme bildet Stamm *13*, der in bestrahlten und unbestrahlten Kulturen zahlreiche Involutionsformen aufwies. Daß die Struktur des Plasmas trotzdem angegriffen war, zeigten Präparate, die nach *Gram* gefärbt wurden. Nach einer Entfärbungszeit von 70 Sekunden fanden sich in allen unbestrahlten Kulturen zahlreiche zusammenhängende grampositive Fäden neben stäbchenförmigen bis kugeligen grampositiven Zerfallsteilen. In den bestrahlten aber lagen sehr viele Hyphen und Zerfallsteile, die nach *Gram* nicht färbbar waren. Sie enthielten kurze färbbare Bezirke und viele runde bis ovale grampositive Einschlüsse, waren aber als Ganzes nicht färbbar. Wurde auf Fleischextrakt-Peptonagar überimpft, so ergaben alle Kulturen Wachstum. Dieses entwickelte sich aber aus bestrahlten Lösungen spärlicher und langsamer als aus unbestrahlten und die Versporung setzte bei den ersteren regelmäßig später ein oder blieb ganz aus. Ebenso

setzte die Farbstoffbildung bei bestrahltem Impfmaterial verzögert ein. Bei der zweiten Generation waren diese Erscheinungen nicht mehr festzustellen.

Es liegt nahe, die Frage nach der biologischen Bedeutung der Farbstoffe zu stellen. Eine Reihe neuerer Autoren, die sich mit ihr beschäftigen, kommen zu dem Schluß, daß das Pigment als Schutz der Hyphen gegen intensives Licht diene. *Ebeling* führt für diese These eine Anzahl von Begründungen an. *Weinmann* und *Stührke* (91) erreichten in Mosten, die durch *Hefen* und *Schimmelpilze* gefärbt waren, nach Entfärbung des Mostes eine Erhöhung der Abtötungsprozente der Organismen von 54 % bei *Hefen* und 48 % bei *Schimmelpilzen* auf über 99 %. Auch bei *Actinomyceten* könnte man nach den Erfahrungen mit ultravioletten Strahlen geneigt sein, die Schutztheorie für die intensivere Pigmentbildung in Anspruch zu nehmen.

Trotz der möglicherweise verschiedenen chemischen Zusammensetzung der Pigmente könnte die biologische Wirkung die gleiche sein, denn ihre Farbwerte kommen einander sehr nahe. Aber es muß berücksichtigt werden, daß die Annahme von der erhöhten Farbstoffbildung als Auslösung gegen Lichtschädigung nur für Umstände Geltung beanspruchen kann, die als durchaus künstlich angesprochen werden müssen und die bei im Boden lebenden Strahlenpilzen — und um solche handelt es sich hier — an ihren natürlichen Standorten so gut wie nie vorliegen werden. Daher scheint es sehr gewagt, anzunehmen, daß die Organismen Substanzen bilden sollten, die rein chemisch auf eine Beeinflussung durch das Licht reagieren. Zudem wurde durch die vorliegenden Untersuchungen der Zusammenhang zwischen Pigmentbildung und Lebensablauf der Pilze aufgezeigt. Daß der Ablauf der Lebensvorgänge von ultravioletten Strahlen aufs stärkste beeinflußt werden kann, ist sehr wahrscheinlich. Es wären eingehende Untersuchungen nötig, um über die Richtung dieser Beeinflussung und damit vielleicht auch über die Ursache der erhöhten Pigmentbildung einigermaßen gesicherte Angaben machen zu können.

Zusammenfassung.

Für 15 *Actinomyces*-Stämme wurden die günstigsten Kulturbedingungen aufgesucht.

Nach ihren morphologischen Merkmalen gehören die Stämme zu der von *Orskow* aufgestellten Gruppe 1. Die Luftsporenbildung war ungleichmäßig und blieb bei einigen während vieler Generationen aus, bis sie als erbliche Eigenschaft spontan erschien.

Durch Änderung der relativen Dampfspannung wurde die Grenze des Wachstums der untersuchten Actinomyceten-Stämme bei 93 % relativer Dampfspannung ermittelt. Das Einsetzen der Versporung

wurde als gesetzmäßig abhängig vom abnehmenden Feuchtigkeitsgehalt der Luft bzw. des Nährbodens wahrscheinlich gemacht; bei Stamm *9* setzte die Versporung bei 98 % relativer Dampfspannung ein.

Die Brauchbarkeit von Nitriten als N-Quelle wurde erwiesen und die Assimilierbarkeit des elementaren Luftstickstoffs durch einen Stamm nachgewiesen.

In bestimmten Lösungen wurden zwei verschiedene Wachstumstypen festgestellt, die entweder die Lösung alkalischer machen oder die Acidität des Substrats ziemlich beträchtlich erhöhen.

Von Inhaltsstoffen fand sich Volutin in allen Stämmen, an dessen Stelle in alten Kulturen fast immer Fett vorkam. Einige Stämme lagerten schon im jungen Mycel reichlich Fett- und Wachsstoffe ab. Glykogen, Chitin und Cellulose konnten nicht nachgewiesen werden.

Das fett- und wachshaltige Mycel ist säurefest, was wahrscheinlich mit den Einlagerungen zusammenhängt.

Die in bestimmten Lösungen gebildete Säure wurde als Milchsäure identifiziert.

Die Actinomyceten zersetzen Cellulose nicht, sie verflüssigen Gelatine, einige haben die Fähigkeit, Fette zu spalten. Ein Ferment zum Koagulieren der Milch wurde nicht nachgewiesen. Die Isolierung der Tyrosinase mißlang.

Das Tageslicht übte keinen merklichen, die Reaktion der Nährlösung dagegen einen ausschlaggebenden Einfluß auf das Auftreten und die Intensität der Pigmentbildung aus.

Aus einigen Stämmen konnte ein hitzebeständiger, in saurer, wässeriger Lösung gelber Farbstoff extrahiert werden. Bei einem dieser Farbstoffe schlägt in alkalischer Lösung die Farbe in Violett um. Die Bildung der Farbstoffe steht in Verbindung mit der von Huminstoffen.

Ultraviolettes Licht übte bei senkrechter Einstrahlung eine starke bakterizide Wirkung aus. Die Farbstoffbildung wurde durch ultraviolettes Licht stark gefördert, doch scheint die Annahme, daß sie als Schutz gegen Lichtschädigung ausgelöst würde, wenig wahrscheinlich. Die Pigmentbildung dürfte vielmehr zusammenhängen mit den gesamten Lebensvorgängen der Organismen.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung des Reichsforschungsrates am mikrobiologischen Institut der Universität Göttingen durchgeführt. Herrn Professor Dr. *Rippel* bin ich für seine liebenswürdige Förderung und für viele Anregungen zu großem Danke verpflichtet.

Literatur.

1) *Anderson, J. A., Peterson, W. H.* u. *Fred, E. B.*, Soil Sci. **25**, 123, 1928. — 2) *Arcularius, J. J.*, Centralbl. f. Bakt. II, **74**, 201, 1928.

3) *Baker, I. A.*, J. Bact. **35**, 625, 1938. — 4) *Barnstein, F.*, Landw. Versuchsstat. **54**, 327, 1900. — 5) *Behr, G.*, diese Zeitschr. **1**, 418, 1930. — 6) *Beijerinck, M. W.*, Proc. Se. Sci. Kon. Akad. Wetenschapen, Amsterdam **13**, 1066, 1911. — 7) *Bertrand, E. I.*, Bull. d. l. Soc. d. chim. biol. **35**, 1285, 1906. — 8) *Bernhauer, K.*, Gärungschem. Prakt., S. 129. Berlin, Jul. Springer, 1936. — 9) *Bergey, D. H.*, Manual of Determ. Bact. London 1939, 5. Aufl. — 10) *Bortels, H.*, Biochem. Zeitschr. **182**, 1927. — 11) *Braun, H.*, *Stamatelakis, A.*, u. *Kondo, S.*, ebenda **145**, 381, 1924.

12) *Caminiti, J.*, Centralbl. f. Bakt. I, **44**, 193, 1907. — 13) *Chalmers, C. H.*, ebenda II, **87**, 1, 1932/33. — 14) *Chatterjee, H.*, ebenda I, **61**, 358, 1912. — 15) *Conn, H. C.*, New York Agric. Exper. Stat. Techn. Bull. **88**, 1921. — 16) *Coblentz, I. G.*, u. *Fulton, H. R.*, Amer. J. of Electrothm. a. Radiolog. **43**, 251, 1925. — 17) *Curran, H. R.*, u. *Evans, Fr. R.*, J. Bact. **36**, 455, 1938.

18) *Danilow, A. N.*, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **43**, 27, 1924. — 19) *Davis, D.*, J. of infect. Dis. **14**, 144, 1914. — 20) *Doebelt, H.*, Ann. Myc. **7**, 315, 1909. 21) *Duché, I.*, C. r. Acad. Sci. **196**, 128, 1933.

22) *Ebeling, R.*, diese Zeitschr. **9**, 1, 1938. — 23) *Eijkmann, C.*, Centralbl. f. Bakt. I, **29**, 841, 1901.

24) *Fermi, Cl.*, u. *Pernossi, L.*, Zeitschr. f. Hyg. **18**, 420, 1894. — 25) *Foster, R.*, u. *Randall, S. B.*, J. Bact. **6**, 143, 1921. — 26) *Fousek, A.*, Mitt. d. Hochsch. f. Bodenkult. **1**, 217, 1912. — 27) *Fritsche, E.*, Arch. f. Hyg. **65**, 181, 1908. — 28) *Frouin, A.*, C. r. d. l'Acad. Sci. **170**, 1671, 1920.

29) *Gates, R. R.*, J. gen. Physiog. **14**, 31, 1930. — 30) *Gorbach, G.*, diese Zeitschr. **1**, 537, 1930. — 31) *Gray, P. H. H.*, u. *Thornton, H. G.*, Centralbl. f. Bakt. II, **78**, 74, 1928. — 32) *Guittonneau, G.*, C. r. Acad. Sci. **179**, 788, 1924.

33) *Heide, S.*, diese Zeitschr. **10**, 135, 1939. — 34) *Henneberg, W.*, Bakt. Molkereikontrolle. Berlin, O. Parey, 1934. — 35) *Heucke, R.*, u. *Henneberg, W.*, Centralbl. f. Bakt. II, **90**, 425, 1934.

36) *Jensen, H. L.*, Soil Sci. **25**, 226, 1928. — 37) *Derselbe*, Proc. Linn. Soc. of New South Wales **56**, 79, 1931. — 38) *Derselbe*, ebenda **59**, 101, 1934. — 39) *Jensen, O.*, Centralbl. f. Bakt. II, **8**, 171, 1902.

40) *Kießling, L. E.*, ebenda II, **89**, 177, 1933/34. — 41) *Klein, F.*, Handb. d. Pflanzenanalyse III, S. 426. Berlin, Jul. Springer, 1932. — 42) *Derselbe*, ebenda II, S. 72. Berlin, Jul. Springer, 1932. — 43) *Knorr, M.*, Centralbl. f. Bakt. I. Orig., **120**, 249, 1931. — 44) *Koch, A.*, Mikrob. Praktikum, S. 30. Berlin, Jul. Springer, 1932. — 45) *Korenjako, A.*, Microbiologie (russisch) **7**, 515, 1938. — 46) *Kresling, E.*, u. *Stern, E.*, Centralbl. f. Bakt. II, **95**, 327, 1936/37. — 47) *Krainsky, A.*, ebenda II, **41**, 649, 1914.

48) *Lehmann-Neumann*, Bakteriologie, 7. Aufl., München 1927. — 49) *Lieske, R.*, Morphologie u. Physiologie der Strahlenpilze (Actinomyceten). Leipzig, Bornträger, 1921. — 50) *Derselbe*, Bakterien und Strahlenpilze in Handb. d. Pflanzenanatomie **6**, Berlin, Bornträger, 1922. — 51) *Derselbe*, Kurzes Lehrb. d. allgem. Bakterienkunde, Berlin, Bornträger, 1921.

52) *Meyer, K.*, Biochem. Zeitschr. **32**, 507, 1911. — 53) *Michaelis, L.*, u. *Nakahara, Y.*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exper. Therap. **36**, 449, 1923. — 54) *Molisch, H.*, Mikrochemie der Pflanzen, S. 118. Jena, G. Fischer, 1921. — 55) *Moycho, M.*, C. r. Acad. Sci. **187**, 1240, 1928.

56) *Nadson, G.*, u. *Philippow, A.*, Röntg. u. Radiol. **5**, 6, 1927. — 57) *Nadson, G.*, u. *Stern, E.*, C. r. Acad. Sci. d. l'USSR. **2**, 1934. — 58) *Näslund, C.*, u. *Dernby, K. G.*, Biochem. Zeitschr. **138**, 497, 1923. — 59) *Negroni, P.*, Fol. Biol. Buenos Aires **83/86**, 358, 1938.

60) *Orskow, J.*, J. Bact. 7, 537, 1922. — 61) *Derselbe*, Investig. into t. morphol. of the ray fungi, Copenhagen, Levin u. Munksgaard, 1923. — 62) *Derselbe*, Centralbl. f. Bakt. II, **98**, 305, 1938.

63) *Pietz, L.*, ebenda II, **99**, 1, 1938/39. — 64) *Prianischnikow, D.*, Biochem. Zeitschr. **198**, 211, 1928.

65) *Raper, H. S.*, Fermentforsch. **9** (neue Folge 2), 206, 1928. — 66) *Raper, H. S.*, u. *Wormall, A.*, Biochem. J. **17**, 454, 1923. — 67) *Reid, R.*, Centralbl. f. Bakt. II, **95**, 379, 1936/37. — 68) *Renner, H.*, Zeitschr. f. Bot. **71**, 305, 1919. — 69) *Rippel, A.*, Zeitschr. f. Pflanzenernährung u. Düngung A. **8**, 268, 1926. — 70) *Derselbe*, Vorlesungen über theoretische Mikrobiologie, S. 88/89. Berlin, Jul. Springer, 1927. — 71) *Rippel, A.*, u. *Witter, P.*, diese Zeitschr. **5**, 24, 1934. — 72) *Rona, P.*, Prakt. f. physiol. Chem. I, S. 303. Berlin, Jul. Springer, 1926. — 73) *Rubentschik, C.*, Centralbl. f. Bakt. II, **76**, 305, 1928.

74) *Scheitz, A.*, diese Zeitschr. **1**, 577, 1930. — 75) *Seifert, O.*, u. *Müller, Fr.*, Taschenb. d. med. klin. Diagnostik, S. 127. Wiesbaden, J. F. Bergmann, 1915. — 76) *Seiffert, G.*, Deutsch. med. Wochenschr. **58**, 1052, 1932. — 77) *Skinner, C. E.*, J. Bact. **35**, 415, 1938. — 78) *Söhngen, N. L.*, Centralbl. f. Bakt. II, **39**, 595, 1913. — 79) *Stapp, C.*, Biochem. Zeitschr. **141**, 42, 1923.

80) *Tempel, E.*, diese Zeitschr. **2**, 40, 1931.

81) *Waksman, S. A.*, Soil Sci. **8**, 71, 1919. — 82) *Derselbe*, ebenda **14**, 61, 1922. — 83) *Derselbe*, J. Bact. **3**, 509, 1918. — 84) *Derselbe*, ebenda **4**, 189, 216, 1919. — 85) *Derselbe*, ebenda **5**, 61, 1920. — 86) *Derselbe*, Principles of soil microb. Baltimore, Baillière, Tindall u. Cox., 1927. — 87) *Waksman, S. A.*, u. *Curtis, R. E.*, Soil Sci. **1**, 99, 1916. — 88) *Waksman, S. A.*, u. *Skinner, C. E.*, J. Bact. **12**, 57, 1926. — 89) *Walderdorf, K.*, Bot. Arch. **6**, 84, 1924. — 90) *Walter, H.*, Zeitschr. f. Bot. **16**, 353, 1924. — 91) *Weinmann, W.*, u. *Stührke, A.*, Vorratspflege u. Lebensmittelforsch. **1**, 183, 1938. — 92) *Witter, P.*, Beiträge zur Kenntnis der Actinomyceten. Diss. Göttingen, 1933. — 93) *Wyss, F.*, Contribution à l'étude de la Tyrosinase. Diss. Genf, 1922.

(Lehrkanzel für Botanik, Warenkunde und technische Mikroskopie der Deutschen technischen Hochschule in Prag.)

Verhalten mikroskopischer Bodenpilze gegenüber in der Natur verbreiteten Wuchsstoffen.

Von

Anneliese Niethammer.

(Eingegangen am 29. Dezember 1939.)

Bereits in früheren Arbeiten wurde mitgeteilt, daß typische mikroskopische Bodenpilze nicht nur im Erdreich, sondern auch in verschiedenen Samen und Früchten verbreitet sind [*Niethammer* (3)]. Bei diesem Vorkommen handelt es sich sowohl um Mycelien, als auch um Konidien, Sporen sowie Sklerotien. Typische Formen sind *Penicillium expansum*, *Penicillium bicolor*, *Rhizopus nigricans*, *Mucor hiemalis*, *Trichoderma Koningi*, *Cladosporium herbarum*, *Macrosporium commune*, *Verticillium albo-atrum*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*. Allen diesen Pilzen ist eigentümlich, daß sie im Kulturversuch in *gereinigten* Zuckerlösungen mangelhaft gedeihen. Überführt man sie auf die Erde des Heimatbodens oder auf die Früchte bzw. Samen, denen sie entstammen, so tritt gutes Wachstum ein.

Nach den Untersuchungen von *Boas* ist das Erdreich und nach den Erfahrungen von *Dagys*, *K. Rippel*, *Veh* sowie *Soeding* sind Früchte und Samen in ihren verschiedenen Teilen reich an Wuchsstoffen. Es lag nun nahe zu prüfen, ob der Zusatz derartiger Wuchsstoffe die Mangelerscheinungen bei dem Wachstum in den gereinigten Zuckerlösungen bessern oder beseitigen kann.

Für die meisten Versuche diente eine 5%ige Saccharoselösung, der 1% Ammonsulfat sowie je 0,1% saures Kaliumphosphat und Magnesiumsulfat zugefügt wurde. Diese Lösung wurde nach der Vorschrift von *Bortels* über Tierkohle gereinigt, und danach wurde 0,0005% reines Eisenchlorid hinzugesetzt. Wir bezeichnen sie als normale Nährlösung. Um den natürlichen Wachstumsbedingungen auf den fleischigen Früchten nahezukommen, wählten wir in einzelnen Fällen statt Saccharose auch Glucose, Fructose oder Mannose. Festzuhalten ist, daß in den gereinigten Lösungen stets ein schwaches oder unzureichendes Wachstum eintritt.

Zur Besserung des Wachstums werden nun verschiedene Zusätze ausgesucht, vor allem geringe Mengen an frischem Material aus Samen und Früchten. *K. Rippel* sowie *Soeding* und *Veh* berichten beispielsweise, daß viele fleischige Früchte, so Pflaumen, Äpfel und Quitten, in allen Teilen der Frucht, besonders den Kernen, reich an Wuchsstoffen sind. An den Samen bzw. Früchten von Leguminosen und Gramineen

Tabelle I. Penicillium expansum: Wirkung verschiedener Zusätze.

Herkunft	Erntegewichte in mg (Mittel von 3 Bestimmungen)					Verbrauch an n/10 NaOH in ccm					Citronensäure nach *Denigès*				
	Fs	Fl	E	St	0	Fs	Fl	E	St	0	Fs	Fl	E	St	0
1. Weintraube	—	256	220	—	98	—	4,6	2,0	—	2,9	—	0	0	—	0
2. Birne	76	220	301	—	103	2,1	2,2	2,8	—	1,8	+	+	+	—	0—+
3. Pflaume	232	258	302	—	101	2,2	2,5	2,6	—	1,0	0	0	0	—	0
4. Pfirsich	280	302	304	288	103	2,3	2,3	2,4	2,5	1,4	+	+	+	+	0
5. Aprikose	281	392	401	398	94	2,4	2,1	1,8	1,9	0,9	+	+	+	+	0
6. Johannisbeere	—	238	301	—	98	—	1,0	1,4	—	1,8	—	0	0	—	0
7. Stachelbeere	—	261	289	—	99	—	1,0	1,5	—	0,8	—	0	0	—	0
8. Apfel	68	201	189	—	102	1,2	2,0	2,3	—	1,8	0—+	0—+	0	—	0
9. Citrone	320	210	—	—	125	3,4	7,8	—	—	4,1	++	+++	—	—	+
10. Orange	222	224	—	—	135	4,4	4,8	—	—	3,4	++	++++	—	—	++
11. Walnuß	221	—	210	—	100	1,8	—	2,2	—	1,00	0	—	0	—	0

sammelte *K. Rippel* und *Dagys* ähnliche Erfahrungen. Unser Arbeitsgang war nun der, daß wir von Fruchtfleisch (Fl), Fruchtschale (Fs), Steinschale (St), Samenschale (Sa), Embryo (E) und Nährgewebe (N) verschiedener Früchte und Samen stecknadelkopfgroße Stücke nehmen und je vier der normalen Nährlösung zusetzten. In zweiter Linie prüften wir den Einfluß organischer Säuren, an denen viele Früchte und auch Samen reich sind. Hier wurden Originalpräparate der Firmen *Merck* und *Kahlbaum* in 0,0001 %igen Lösungen verwendet. Zum Schluß prüften wir noch den Einfluß geringer Mengen von seltenen Elementen, die in Früchten sowie im Erdreich vorhanden sein können. Wir erwähnen Mangan, Kobalt und Bor, die in 0,0001 %igen Lösungen benutzt wurden.

Die Versuche wurden in Erlenmeyerkolben aus neuem böhmischen Kavalierglas ausgeführt. Jeder Kolben wurde mit 20 ccm der normalen Nährlösung beschickt; je vier Kolben blieben immer ohne Zusatz, je drei weitere wurden mit den verschiedensten Zusätzen versehen. Gemeinsam wurden sie 15 Minuten im strömenden Dampf sterilisiert. Nach dem Beimpfen mit den Pilzkonidien oder Sporen fanden sie in einem Dunkelzimmer des Instituts bei 18 bis 24° C Aufstellung. Die Versuchsdauer betrug je nach der Art 10 bis 28 Tage. Wir geben hier eine allgemeine Beschreibung der Wachstumsbilder, die bei den einzelnen Stämmen einer Art zusammengefaßt werden kann. Vielfach sind die Erntegewichte der

Pilze nach Trocknen bei 80° C angeführt. Für viele Pilzstämme ist nach den Erfahrungen *Bernhauers* bekannt, daß sie in den Kulturlösungen Säure, oft Citronensäure, bilden. Wir prüfen mit n/10 Natronlauge unter Benutzung von Phenolphthalein als Indikator auf die Säuremenge und geben sie in ccm dieser Lauge an. Die verbrauchte Kulturflüssigkeit wird zu diesem Zwecke in einem Maßkölbchen auf 100 aufgegossen und davon stets 10 ccm für die Titration benutzt. Auf Citronensäure wurde qualitativ mit dem Reagens von *Denigès* (*Rosenthaler*) geprüft.

Wir teilen nun die Ergebnisse mit.

Reihe A. Auf der normalen Nährlösung prüften wir den Einfluß der kleinen Partikelchen von verschiedenen Samen und Früchten; in den Tabellen sind die oben gewählten Zeichen zu beachten. Allgemein merken wir an, daß die Pilze stets Zusätze aus der Frucht bzw. dem Samen empfangen, denen sie entstammen.

Penicillium expansum ist in Früchten sowie in Samen sehr verbreitet, so daß wir Gelegenheit hatten viele Stämme zu prüfen. Das ermittelte Ergebnis ist recht ähnlich und wird hier in Tabelle I zusammengefaßt. Die Versuchsdauer betrug stets 21 Tage.

In der normalen Nährlösung ist bei allen Stämmen die Ausbildung brüchiger, leichter Decken mit einem blaugrünen, glatten Konidienrasen zu verzeichnen. Flüssigkeit sowie Unterseite der Kulturen bleiben ungefärbt. Die Zusätze begünstigen, von einzelnen Ausnahmen abgesehen, die Entwicklung der Pilzdecken, welche nun fest sind und den typisch in Bündel und Ringe aufgelösten Konidienrasen haben [vgl. *Niethammer* (2)]. Die Unterseite der Decken ist gelb, mit gelegentlich eingestreuten roten Punkten; die Kulturflüssigkeit ist hellgelb Bei den Stämmen 5, 6 und 8 sind unter *E* auch gelbe Sklerotien zu beobachten. Die Beigabe von Schalenteilchen setzt bei den Stämmen 2 und 8 den Ernteertrag herab; hier ist an die Anwesenheit von Hemmungsstoffen zu denken (vgl. *Soeding* und *Veh*). Im Einklange mit ähnlichen Erfahrungen von *Bernhauer* ist auch hier festzustellen, daß die Säurebildung der einzelnen Stämme nicht gleich ist und daß auch hier den Zusätzen Bedeutung zukommen kann. Ebenso war aus praktischen Versuchen bereits bekannt, daß nur manche Stämme zur Bildung der Citronensäure befähigt sind. Die von uns gewählte Angabe + bedeutet, daß der positive Ausfall der Reaktion auf die Anwesenheit dieser Säure hinweist; + + bzw. + + + gibt an, daß die Reaktion kräftig bzw. sehr kräftig war.

Aus den Früchten von *Triticum sativum* und den Samen von *Soja hispida* isolierten wir *Penicillium bicolor.* Tabelle II zeigt einen Versuch mit diesem Pilz. Die Kulturdauer betrug 21 Tage.

Tabelle II. Penicillium bicolor.

Herkunft	Erntegewichte in mg				Verbrauch ccm n/10 NaOH			
	Sa	E	N	0	Sa	E	N	0
Weizen	—	190	210	90	—	2,6	2,9	1,8
Sojabohne	220	280	—	98	2,8	3,1	—	2,0

Citronensäure kann nicht nachgewiesen werden.

In der normalen Nährlösung werden helle Decken mit einem schwach gelben Rand gebildet. Die gewählten Zusätze verändern das Wachstumsbild; wir erkennen die typischen sitzenden grüngelben Koremien [vgl. *Niethammer* (1)]. Die Unterseite der Kultur hat rote Punkte, die Flüssigkeit ist gelb.

Trichoderma Koningi konnte nur einmal von dem Steinkerne eines Pfirsich isoliert werden. Daselbst wurden die typischen runden, grünen Kolonien geformt. Aus früheren Versuchen war bereits bekannt, daß dieser Pilz in Nährlösung sehr schwer zu ziehen ist. Die gleiche Erfahrung wurde hier gesammelt. Die Zusätze Sa und E ermöglichten die Ausbildung der typischen Decken, mit den grünen, ringförmig wachsenden Konidienrasen. Nach 28 Versuchstagen reagierte die Kulturflüssigkeit durchweg neutral.

Rhizopus nigricans gewannen wir aus dem Fruchtfleisch des Pfirsichs sowie des Apfels. Bei dieser rasch wachsenden Art konnte der Versuch, der in Tabelle III dargestellt ist, nach 10 Tagen abgebrochen werden.

Tabelle III. Rhizopus nigricans.

Herkunft	Erntegewichte in mg				Verbrauch an ccm NaOH			
	Fl	E	St	0	Fl	E	St	0
Pfirsich	129	—	131	88	3,5	—	2,5	1,9
Apfel	124	132	—	81	2.9	3.1	—	1.8

Citronensäure konnte nicht festgestellt werden.

Ohne Zusatz entstanden leichte Lager mit kurzen Sporangienträgern. Die Zusätze begünstigten die Mycelentwicklung sowie das Wachstum der dunklen, bogenförmigen Sporangienträger. *Mucor hiemalis*, der aus Birnen und Äpfeln isoliert wurde, zeigte das gleiche Verhalten.

Cladosporium herbarum isolierten wir aus dem Fruchtfleisch des Apfels, der Birne, der Kirsche sowie der Tomate. Wachstum sowie Säurebildung sind so übereinstimmend, daß wir nur ein Protokoll (26 Tage Kulturdauer) über einen Stamm aus der Tomate wiedergeben (Tabelle IV).

Tabelle IV. Cladosporium herbarum.

	Fs	Fl	E	0
Erntegewichte in mg	180	150	201	60
Verbrauch an ccm NaOH	3,2	3,5	2,4	2,1

Citronensäure war nicht zu ermitteln.

Die Zusätze begünstigten das Wachstum recht erheblich; die Konidienbildung wurde ermöglicht.

Macrosporium commune aus dem Fruchtfleisch der Erdbeere, des Pfirsichs sowie der Schale der Orange gedeiht in der normalen Nährlösung sehr schlecht, es kommt nur zur Bildung weißer Flocken, die allmählich zusammenfließen. Die Zusätze Fs, Fl, Sa und E blieben hier meist ohne Einfluß; nur Fs der Orange regte das Wachstum stark an und ermöglichte die Bildung der typischen Konidien. Die Säurebildung war stets schwach, Citronensäure konnte nicht festgestellt werden. Ohne Einfluß blieben die

Zusätzé Fs, Fl, E und Sa bei *Verticillium alboatrum* aus der Tomate, welches auf der normalen Nährlösung fast keine Entwicklung zeigte.

Botrytis cinerea aus den Früchten des Apfels, der Kirsche sowie des Pfirsichs lehnt die normale Nährlösung ab. Zusätze von Fl, E, Sa bzw. St lassen desgleichen nur die Ausbildung heller Flocken zu, die nach etwa 20 Tagen zu einer leichten Decke zusammenfließen. Konidienbildung ist nicht zu verzeichnen. Auf die mangelhafte Entwicklung vieler *Fusarium*-Arten in reinen Nährlösungen ist schon aufmerksam gemacht worden [vgl. *Niethammer* (4)]. An *Fusarium lycopersici* sowie *Fusarium discolor* aus Roggenkörnern wurden diese Erfahrungen hier bestätigt. Nun geben wir Bericht über *Fusarium discolor* nach 28 Versuchstagen (Tabelle V).

Tabelle V. Fusarium discolor.

	Fs	E	N	0
Erntegewichte in mg	204	206	188	99
Verbrauch an ccm n/10 NaOH	0,8	0,95	0,9	0,8
Citronensäure	0	0	0	

Die mikroskopische Kontrolle lehrte hier, daß der Zusatz E die Ausbildung einzelner typischer Konidien ermöglicht. Die Deckenbildung zeigte stets Förderung durch alle Zusätze.

Die hier mitgeteilten Versuche wurden *alle* mehrmals wiederholt: ihnen ist zu entnehmen, daß durch geringfügige Zusätze von Pflanzenmaterial, das nach den Erfahrungen in der Literatur *Wuchsstoffe* enthält, das Wachstum mancher mikroskopischer Pilze in gereinigten Zuckerlösungen gefördert werden kann.

Die gleichen Versuchsreihen wurden nun noch mit 5 %igen, ebenfalls gereinigten Lösungen von Glucose, Fructose, einem Gemenge der beiden, ferner Mannose durchgeführt. Grundsätzliche Unterschiede gegenüber Saccharose waren nicht festzustellen, so daß eine Wiedergabe der Ergebnisse wegfallen kann.

In *Reihe B* wurde geprüft, ob den kleinen Mengen an organischen Säuren, die in Früchten und Samen sehr verbreitet sind, bei dem Wachstum der Pilze in Nährlösungen eine Bedeutung zukommen kann.

Penicillium expansum. Citronen- (1), Bernstein- (2), Oxal (3)-, Wein- (4), Salicyl- (5) und Apfelsäure (6) begünstigten, in 0,0001 %iger Lösung gereicht, stets die Entwicklung der verschiedenen Stämme. Wir greifen nur ein Beispiel, den Stamm aus der Orange nach einer Kulturdauer von 21 Tagen heraus (Tabelle VI).

Tabelle VI. Penicillium expansum.

	1	2	3	4	5	6	0
Erntegewichte in mg	201	204	208	201	180	233	115
Verbrauch an ccm n/10 NaOH	3,0	3,3	5,0	4,0	3,9	2,5	2,8
Citronensäure	+	++	++	++	++	+	+

Die Förderungen sind allgemein etwas geringer als in der Reihe A; Deckenbildung und Konidienbildung werden aber stets gefördert.

Die verschiedenen Stämme von *Botrytis cinerea* wurden durch 0,0001 %ige Lösungen der Citronen- (1) und Weinsäure (4) nicht nur zu stärkerem Wachstum, sondern auch zur Bildung von Konidien angeregt. Wir berichten über unsere Erfahrungen an dem Stamm aus der Kirsche nach 24 Versuchstagen (Tabelle VII).

Tabelle VII. Botrytis cinerea.

	1	4	0
Erntegewichte in mg	81	94	22
Verbrauch an ccm n/10 NaOH	0,9	1,0	0,5
Citronensäure nach *Denigès*	+	0	0

Bei *Trichoderma Koningi* bedingten 0,0001 %ige Lösungen von Citronen- sowie Weinsäure die Ausbildung der typischen wolligen Decken. Konidienbildung konnte nicht erzielt werden. Bei *Cladosporium herbarum* prüften wir an mehreren Stämmen ohne nennenswerten Erfolg die sechs Säuren.

Fettsäuren, denen im Stoffwechsel Bedeutung zukommen kann, wurden in 0,0001 %igen Lösungen an den Stämmen des *Penicillium expansum* geprüft. Stearin-, Caprin- sowie Laurinsäure begünstigten stets die Deckenbildung und erhöhten die Konidienbildung sowie die Erntegewichte. Die Versuchsdauer erstreckte sich wieder über 21 Tage. Die gleiche Dosis von Caprylsäure hemmte die Entwicklung.

Die Serie B lehrt uns, daß auch der Zusatz kleiner Mengen an organischen Säuren, die in der Natur recht verbreitet sind, die Entwicklung mancher Pilzdecken fördern kann.

In der nun folgenden *Reihe C* haben wir noch über den Einfluß seltener Elemente, welche in Boden sowie Frucht verbreitet sein können, zu berichten. Wir prüften Manganchlorid (Mn), Kobaltsulfat (Co) und Kobaltchlorid ($CoCl_2$) sowie Borsäure (B).

Penicillium expansum. Wir berichten nach einer Versuchsdauer von 21 Tagen über einen Stamm aus dem Apfel (Tabelle VIII).

Tabelle VIII. Penicillium expansum.

	Mn	Co	B	0
Erntegewichte in mg	250	258	290	125
Verbrauch an ccm NaOH	4,5	5,0	4,5	2,2
Citronensäure nach *Denigès*	+	++	++	+

Alle Zusätze besserten die Deckenbildung und erhöhten die Bildung von Konidien. Der günstige Einfluß der Borsäure ist hervorzuheben, da Äpfel stets etwas Bor enthalten.

Trichoderma koningi zeigte nach 28 Tagen Kulturdauer folgendes Ergebnis.

Tabelle IX. Trichoderma koningi.

	Mn	Co	$CoCl_2$	B	0
Erntegewichte in mg	298	348	380	300	110
Verbrauch an ccm NaOH	2,0	0,7	2,1	2,3	0,1

Citronensäure wurde nicht gefaßt.

Alle die hier gewählten Zusätze ermöglichten die Konidienbildung. Eine eigentümliche Rotfärbung der Unterseite der Decken war zu verzeichnen.

Unsere Versuche liefern folgende Ergebnisse. Viele mikroskopische Bodenpilze aus Früchten und Samen gedeihen in gereinigten Zuckerlösungen schlecht. Fügt man der Nährlösung kleine Stückchen aus unterschiedlichen Teilen von Frucht und Samen hinzu, so kann bei *manchen, aber nicht allen Arten* Mycelwachstum und Fruktifikation gefördert werden. Möglicherweise ist diese Anregung durch die in Samen und Früchten stark verbreiteten *Wuchsstoffe* bedingt, deren Wirksamkeit schon bei sehr geringen Mengen gegeben ist. *Organische Säuren*, sowie *seltene Elemente*, die in Frucht und Samen desgleichen vorhanden sein können, entfalten in manchen Fällen eine *ähnliche* Wirkung. Diese Beobachtung könnte dafür sprechen, daß es sich um gewisse Reize handelt, die durch unterschiedliche chemische Verbindungen, zu denen auch die Wuchsstoffe gehören, ausgelöst wird. Unsere Versuche zeigen wieder, daß es wichtig ist, bei der Kultur der Pilze in synthetischen Lösungen auf die natürlichen Verhältnisse, denen die Formen entstammen, Rücksicht zu nehmen. Alle hier angeführten Arten sind befähigt im Erdreich zu wachsen und zu fruktifizieren.

Literatur.

Bernhauer, K, Gärungschemisches Praktikum. Berlin, Julius Springer, 1939. — *Boas, F.*, Angew. Bot. **18**, 348, 1936. — *Bortels, H*, Biochem. Zeitschr. **182**, 301, 1937. — *Dagys, I.*, Protoplasma **27**, 106, 1936. — *Niethammer, A.* (1), Die mikroskopischen Bodenpilze, 1937, Haag. — *Dieselbe* (2), Centralbl. f. Bakt. II, **98**, 65, 1938. — *Dieselbe* (3), diese Zeitschr. **10**, 13, 1939. — *Dieselbe* (4), Centralbl. f. Bakt. II, **100**, 294, 1939. — *Rippel, K.*, Planta **29**, 1, 1938. — *Rosenthaler, L.*, Grundzüge chemischer Pflanzenuntersuchung. Berlin, Julius Springer, 1923. — *Veh, R. von*, und *H. Soeding*, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **55**, 270, 1937.

(Aus dem Botanischen Institut der kgl. ung. Universität für technische und Wirtschaftswissenschaften, Sopron.)

Ergänzende Bemerkungen zu unseren Arbeiten über die Lichtökologie der Bodenalgen.

Von

D. Fehér und **M. Frank.**

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 16. Januar 1940.)

In einer im Bd. 10 dieser Zeitschrift erschienenen Arbeit hat *Baatz* (1) zu unseren diesbezüglichen Forschungen Stellung genommen (2). Da die Schlußfolgerungen dieser Arbeit von unseren Ergebnissen bzw. von den daran geknüpften Folgerungen wesentlich abweichen und nach unserer Ansicht auch einen Teil unserer dort gemachten Feststellungen außer acht lassen, sehen wir uns veranlaßt, hierzu in aller Kürze folgendes zu bemerken.

Die erwähnte Arbeit gliedert sich im wesentlichen in zwei Teile. In dem ersten Teil werden die Versuche des Verfassers besprochen, die er mit Bodenalgen im kurzwelligen Ultrarot gemacht hat. In dem zweiten Teil, der mehr spekulativer Natur ist, befaßt er sich dann mit den Schlußfolgerungen unserer zweiten Arbeit, ohne daß er dazu durch entsprechende Versuche das nötige Beweismaterial herbeigeschafft hätte.

Die Feststellungen des Verfassers, daß das kurzwellige Ultrarot für das autotrophe Wachstum der Bodenalgen wirkungslos ist, stimmen mit den Ergebnissen überein, die wir in dem zweiten Teil unserer Arbeit bereits mitteilten; sie bestätigen daher vollauf unsere Ergebnisse über die Wirkungslosigkeit des infraroten Lichtes bei der Dunkelassimilation der Bodenalgen. In unserer ersten Arbeit haben wir mit Rücksicht darauf, daß auch wir die Energiequelle des autotrophen Algenwachstums zunächst in der Strahlungsenergie der Sonne suchten, als vermutliche Ursache bzw. Energiequelle die infraroten Strahlen angenommen, da, wie auch unsere Messungen gezeigt haben, die Strahlungsenergie der Sonne, durch die obersten Bodenschichten umgeformt, nur in diesen Formen die unterirdischen Lebensräume der Bodenalgen erreichen kann. Die Tatsache jedoch, daß das autotrophe Algenwachstum ohne den sichtbaren Lichtanteil stattfinden kann, war natürlich vollkommen unabhängig davon, welche Formen der strahlenden Energie hierfür verantwortlich gemacht werden können. Im Laufe der weiteren Untersuchungen stellte sich dann deutlich heraus, daß für das autotrophe Dunkelwachstum der Bodenalgen Wellenbezirke der strah-

lenden Energie, die zwischen 30000 und 3000 Å liegen, wirkungslos sind. Die von *Baatz* verwendete infrarote Strahlung befindet sich innerhalb dieses Bereiches. Die neueren Untersuchungen, die mit Bodenarten verschiedener Strahlungsaktivität durchgeführt wurden, haben dann gezeigt, daß die gesuchte Energiequelle aller Wahrscheinlichkeit nach in den unterhalb von 3000 Å liegenden Wellenbezirken der unsichtbaren strahlenden Energie zu suchen sind. Ob diese Strahlen irdischen oder kosmischen Ursprungs sind, bedarf weiterer eingehender Untersuchungen.

Unsere diesbezüglichen Untersuchungen sind bereits in vollem Gange. *D. Fehér* hat in dieser Richtung in einer kürzlich erschienenen Arbeit hierüber eine kurze Mitteilung gemacht (3). Es gelang ihm nämlich durch die Verwendung von schwach strahlungsaktiver Erde bei Versuchen, die 2 Jahre lang liefen, das Algenwachstum zu unterbinden und in den Parallelkulturen, die in aktive Erde eingebettet waren, sämtliche Phasen der von uns beschriebenen autotrophen Algenwachstums experimentell hervorzurufen.

Wir müssen jedoch bemerken, daß die Ergebnisse derart umfassender Versuche, wie wir sie durchgeführt haben, auf Grund von Einzelversuchen, wie sie *Baatz* veröffentlichte und die kaum mehr als 3 Monate dauerten, nicht beurteilt werden können. Das eigentliche autotrophe Algenwachstum kam bei uns erst nach 4 Monaten zum Vorschein. Außerdem bietet die Fadenalge *Oscillatoria*, die in unseren Kulturen in verschwindend kleinem Anteile vorgekommen ist, kein dankbares Objekt dafür, um von seinem Verhalten auf unsere Ergebnisse, die auf Grund eines vielseitigen und umfassenden Beobachtungsmaterials abgeleitet worden sind, derartige weitgehende Schlüsse zu ziehen, wie das von *Baatz* gemacht wurde.

Die Bemerkung, daß das Flächenwachstum in unseren Kulturen nur geringfügig war, ist ebenfalls nicht zutreffend. Wenn man zunächst die in Frage kommenden ganz geringen Energiemengen und den komplizierten inneren Aufbau des gesamten Adaptationsvorganges in Betracht zieht, so wird man bei den Versuchen 2b und 3, wo Flächenzunahmen von beinahe 200 % vorgekommen sind, von einem ganz deutlichen Flächenzuwachs reden können.

Daß wir Mischkulturen verwendeten, wird dadurch gerechtfertigt, daß zunächst die Arten herausgefunden werden müßten, die durch ihre individuelle Anpassungs- und Reaktionsfähigkeit später dann zur Herstellung von Reinkulturen herangezogen werden können. Wir haben jedesmal ein Stück der natürlichen Lebensgemeinschaft der Algen auf unser Kultursubstrat gebracht. Als solches haben wir ausgeglühten Meeressand verwendet, der von allen seinen organischen Bestandteilen befreit war und mit einer anorganischen Nährlösung gesättigt wurde.

Mit dem Thallusstück wurde ein Stück der aktiven Lebensgemeinschaft der Algen mitgenommen. Daß dieser außer Algen auch ihre heterotrophische Begleiter: die Bakterien und Pilze angehören, ist natürlich. Es vergeht dann eine geraume Zeit, bis das biologische Gleichgewicht dieses kleinen Lebensraumes hergestellt ist. Dabei werden alle Individuen, die sich den neuen veränderten Verhältnissen nicht anpassen können, absterben und durch die heterotrophen Mikroorganismen verarbeitet. Es beginnt aber

inzwischen die neue Aufbauarbeit, deren Arbeitsleistung nach den Energiemengen der neuen unsichtbaren Strahlung abgestimmt wird. Es wird inzwischen auch ein Teil der Algen auf dem normalen Wege ihrer Lebensentwicklung absterben. Sie werden von den begleitenden Bakterien und Pilzen ebenfalls verarbeitet. Um die Lebensmöglichkeiten der verbleibenden anpassungs- und adaptationsfähigen Algen zu sichern, muß sich also zwischen Abbau und Aufbau ein gewisses biologisches Gleichgewicht einstellen, dessen Schwerpunkt je nach der Auf- oder nach der Abbauseite verschoben werden kann.

Dies wird in Anbetracht der Tatsache, daß Nährstoffe, Wasser und Wärme im Optimum geboten werden, hauptsächlich von der Energiemenge abhängen, die zur Aufbauarbeit zur Verfügung steht. In unseren Versuchen, die mit schwach strahlungsaktivem Sand durchgeführt wurden, können wir jetzt, nach dem Zeitraum von 2 Jahren, währenddessen die Kulturen zwar am Leben blieben, aber weder nennenswertes Wachstum noch Bewegungen zeigten, feststellen, daß hier sich Aufbau und Abbau wahrscheinlich gleichmäßig die Waage halten. Wird jedoch die strahlungsaktivere Tonerde als Einbettungsmaterial verwendet, so kommt es bald zu den Erscheinungen des autotrophen Algenwachstums, die wir bereits ausführlich beschrieben haben.

Sollte daher die auch von *Baatz* betonte heterotrophe Lebensweise der Algen, eine Eigenschaft, die ihnen der Theorie zufolge bei Abschluß des sichtbaren Lichtanteils zukommt, auch hier auftreten, so müßte diese, da wir einen von allen organischen Beimengungen befreiten Nährboden verwendeten, innerhalb von einigen Monaten zur vollständigen Vernichtung der lebendigen Masse der Algen führen, so daß schließlich nur die Dauerformen bzw. Sporen von Pilzen und Bakterien und von den wenigen diesen heterotrophischen Vernichtungsprozeß durchlebenden Algen übrigbleiben. Daß dabei nach 4 bis 6 Monaten kein oft 150 bis 200 % betragendes Flächenwachstum und nach 6 bis 8 Monaten keine neue taktischen Wachstumsbewegungen möglich sein könnten, glauben wir einem jeden, der sich je einmal mit der Fortzüchtung von Dunkelkulturen von Mikroorganismen beschäftigt hat, nicht näher erklären zu müssen.

Die von uns angegebenen Zeitspannen dürfen natürlich nicht als feststehend betrachtet werden. Die biologischen Bedingungen, darunter vor allem die Temperatur und die individuellen Eigenschaften der Algen, spielen dabei eine wohl zu beachtende Rolle. Bei der Entscheidung dieses Problems kommt auch dem Zeitfaktor eine ausschlaggebende Bedeutung zu, dessen Nichtbeachtung zu Fehlschlüssen führen kann. Daß das autotrophe Wachstum beim Abschluß der mächtigen Energiequelle der sichtbaren strahlenden Energie, in Anbetracht der ganz geringen Energien der zur Verfügung stehenden Strahlungsquellen, nicht in das Unbegrenzte übergehen kann, ist selbstverständlich. Es geht nur so lange vonstatten, bis das Gleichgewicht zwischen Abbau und Aufbau erreicht wird. Dann erreicht es einen stationären Zustand, der jahrelang erhalten bleiben kann. Die Größe der zur Verfügung stehenden Energiemengen bildet daher den begrenzenden Faktor, der neben dem Zeitfaktor den Verlauf des gesamten Vorganges entscheidend beeinflußt.

Daß bei der Beurteilung dieses Fragenkomplexes die Erhaltung der ursprünglichen Chlorophyllfarbe nicht das Entscheidende ist, geben wir auch gerne zu. Sie gehört aber zu den Eigenschaften der autotrophen Pflanzenzelle, die nicht nur auf die Störungen der Licht-, oder besser gesagt der Strahlungsenergie, sondern auch auf die geringsten Störungen des Stoffhaushaltes der Pflanzen sofort reagiert.

Wir machen uns natürlich keine übertriebenen Vorstellungen von dem Zweckmäßigkeitsgesetz der Natur. Die Annahme jedoch, daß heterotroph lebende Algen auch nach 2 Jahren die ursprüngliche frische Farbe ihres angeblich außer Gebrauch gesetzten Chlorophyllapparats unverändert

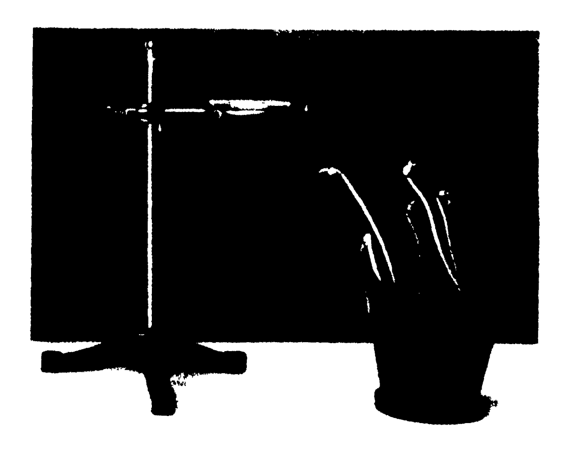


Abb. 1. *Phaseolus vulgaris.* Strahlungsaktive Substanz 6 g U_3O_8 in einer Glasdose (β- und γ-Strahlen). Versuchsdauer 17 Tage.

erhalten, sogar bei ihren Lebenserscheinungen, wozu auch ihre fortgesetzten Teilungen gehören, diese trotz des Umstandes, daß dafür keine Notwendigkeit bestehen sollte, nochmals und wiederholt ausbilden, gehört zu Vorstellungen, in deren weiteren Diskussion uns einzulassen wir nicht für notwendig halten.

Daß Berührungs- und chemische Reize bei Phase III auch eine gewisse Rolle spielen können, steht außer Zweifel. Allein der Umstand, daß die Phase III erst dann auftritt, wenn die Kulturen in aktive Erde eingebettet werden, beweist es deutlich, daß hier die Wirkung von unsichtbaren Strahlen, die von der Erde ausgesendet werden, die entscheidende Rolle spielt.

Diese Feststellung wurde wenigstens mittelbar durch unsere letzten Versuche, die mit höheren Pflanzen durchgeführt worden sind, klar bestätigt. *Es gelang uns nämlich bei Dunkelkulturen von höheren Pflanzen durch die unsichtbaren γ- und β-Strahlen des Urans tropische Reizbewegungen auszulösen und durch diese Formen der unsichtbaren strahlenden Energie die Reizwirkung des Lichtes zu ersetzen.* Obwohl wir

über diese Untersuchungen noch ausführlich berichten werden, bringen wir zur vorläufigen Orientierung ein typisches Beispiel (siehe Abb. 1, S. 83).

Aus allen diesen geht deutlich hervor, daß kein Grund dafür vorliegt, in Anbetracht der Versuchsergebnisse von Baatz an unseren, durch weitgehende und langdauernde Versuche abgeleiteten Schlußfolgerungen vorläufig auch nur das Geringste zu ändern.

Wir werden übrigens auf diesen Gegenstand auf Grund unserer neueren Untersuchungen demnächst im Rahmen einer ausführlichen Arbeit noch zurückkommen.

Literatur.

1) *Baatz, I.*, diese Zeitschr. **10**, 508, 1939. — 2) *Fehér, D.*, u. *M. Frank* ebenda **7**, 1, 1936; **10**, 347, 1939. — 3) *Fehér, D.*, Untersuchungen über das autotrophe Wachstum der Pflanzen im Dunkeln. (Mitteilungen aus dem Botanischen Institut der kgl. ung. Universität für technische und wirtschaftliche Wissenschaften, Sopron, 1939.)

(Aus der Biologischen Versuchsabteilung der Maschinenfabrik
Arthur Vondran, Halle a. d. S.)

Ein neuer Nährboden zu Keimversuchen mit Getreidepilzsporen.

(Ustilago avenae, U. tritici, U. hordei, Tilletia tritici und Helminthosporium gramineum.)

Von

Josef Keil.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 23. Januar 1940.)

Im Rahmen der Bekämpfungsmöglichkeit der Getreidepilze nach dem *Vondran*-Verfahren erwies es sich als notwendig, eine einfache Methode zu finden, mit deren Hilfe sich rasch und sicher in größerem Umfang die Pilzsporen auf ihre Lebens- und Keimfähigkeit prüfen ließen. Hierzu mußte in erster Linie ein Nährboden in Frage kommen, der sowohl möglichst schon nach dem 1. oder 2. Tag der Sporenaussaat den positiven oder negativen Ausgang der Sporenbehandlung als auch deren anderweitigen Folgen auf die Pilzentwicklung abzulesen gestattete. Während die Versuchsergebnisse zur Getreidepilzbekämpfung nach dem *Vondran*-Verfahren, das auch auf diesem Gebiete ungeahnte Möglichkeiten zu entfalten verspricht, und das neben anderen Vorteilen alle Nachteile der bisherigen Pilzbekämpfung vermissen läßt, an anderer Stelle mitgeteilt werden sollen, sei heute zunächst von einem neuen Pilznährboden berichtet.

Die genannten an den Nährboden zu stellenden Forderungen erschöpfen sich in der Hauptsache in der allgemeineren Frage der Keimbegünstigung. Dieses Problem ist besonders in jüngster Zeit stark bearbeitet worden. Zu seiner Lösung werden immer wieder die zwei Themen angeschlagen: 1. Keimungsstimulantien, 2. Entfernung von genuinen keimungshemmenden Stoffen. Setzt man voraus, daß die Sporenkeimung von den gleichen Faktoren abhängig ist wie die Samenkeimung, so sind neben den Grundbedingungen der Keimung (Feuchtigkeit, Temperatur, Sauerstoff) auch mehr oder weniger spezifische Stimulantien und oft ein hemmstoffadsorbierendes Substrat zu fordern.

In möglichst nahem Anschluß an die natürlichen Verhältnisse müßten die stimulierenden Stoffe für die Sporenkeimung der Getreidepilze durch Wasserauszüge aus Getreide zu gewinnen sein, und bezüglich der Entfernung etwa vorhandener genuiner Hemmstoffe hätte man sich

auf die Ergebnisse der neueren keimungsphysiologischen Forschung zu stützen und die dort benutzten hemmstoffadsorbierenden Substrate zu verwenden (vgl. *Borriss* 1936, *Laibach* und *Keil* 1937, *Keil* 1939). Von diesen Erwägungen ging ich bei der Anfertigung des neuen Pilznährbodens aus.

Die Grundsubstanz bildete die übliche Agarlösung (2,5 % Agar-Agar in dest. Wasser). Für je 1 Liter Agarlösung bereitete ich einen wässerigen Extrakt aus 250 g Hafer durch einstündiges Kochen, und zwar so, daß sich 250 ccm Extraktflüssigkeit abfiltrieren ließen (durch Leinentuch). Hierzu kamen dann 2 % Traubenzucker und 1 % feinpulverisierte Tierkohle (alles bezogen auf die Menge Agarlösung). Dieses Gemisch wurde einige Minuten gekocht und dann in den verflüssigten Agar geschüttet. Das Ganze blieb noch kurze Zeit im kochenden Wasserbad, ehe mit dem Ausgießen in Platten begonnen wurde.

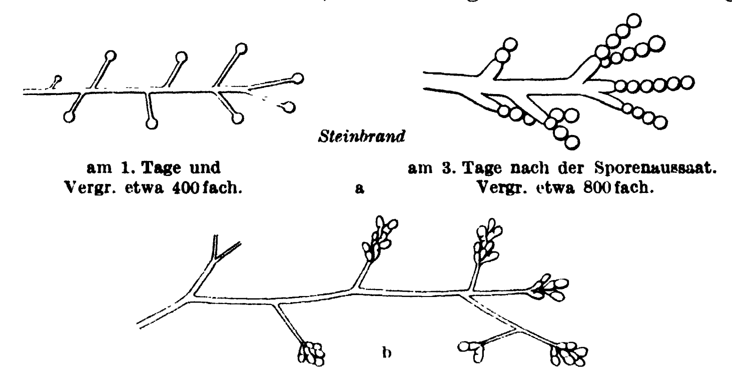
Auf solchen Nährböden ausgeimpft und in einen Brutschrank (26° C) gestellt, entwickeln die Flug- und Steinbrandsporen, sowie die Konidien der Streifenkrankheit der Gerste bald ein gutes aber eigentümliches Wachstum. Allerdings tritt noch gern auf diesen Böden in hohem Maße Schimmelbildung auf. Ich versuchte daher durch verschiedene Zusätze — und diese in verschiedenen Konzentrationen – eine weitgehendere Spezifität des Nährbodens zu erreichen. Dabei stellte es sich heraus, daß ein Zusatz von 0,6 % KOH[1] Keimung und Wachstum der Brandsporen und *Helminthosporium*-Konidien außerordentlich begünstigt, die Schimmelbildung aber nahezu restlos unterdrückt. Späterhin beobachtete ich jedoch, daß durch 0,6 % KOH nicht alle *Aspergillus*-Arten (oder *Aspergillus*-Rassen ?) in ihrer Entwicklung so stark gehemmt werden. Während aber alle hier untersuchten Schimmelarten auf einem 0,1 bis 0,2 % Essigsäure enthaltenden Nährboden so gut wie auf neutralem wuchsen, unterblieb auf solchen sauren Böden gänzlich die Keimung der *Ustilago*- und *Tilletia*-Sporen, was übrigens mit verschiedenen diesbezüglichen Literaturangaben in Einklang steht.

Auf dem kaliumhydroxydhaltigen Nährboden ist schon nach 24 Stunden die Keimung der Flugbrand- und *Tilletia*-Sporen deutlich sichtbar; es handelt sich dabei um ein Hyphenwachstum, wie es bei Brandpilzkulturen völlig ungewohnt ist. Nach weiteren 24 Stunden ist die beimpfte Stelle der Agarplatte von einem feinen, bräunlichweißen bis grauweißen (je nach Pilzart) Pilzrasen überzogen. Unter dem Mikroskop bei schwacher Vergrößerung offenbart sich dieses Wachstum zunächst als dichtstehende aber unregelmäßig an den Hyphen sitzende, mehr oder weniger kurze Ketten aus runden Gebilden, die am ehesten *Aspergillus*-Konidien ähneln (aber deutlich größer sind). Im mikroskopischen Präparat sieht man dann das meist im Agar verlaufende dichte, mäßig verzweigte Mycel und runde, konidienartige

[1] Das KOH-Optimum ist bei den einzelnen Pilzarten etwas verschieden.

Körper, die die Größe von Flugbrandsporen aufweisen (Abb. 1a). Dabei ist es so, daß sich die Wachstumsbilder, die die verschiedenen Flugbrandarten ergeben, nicht ohne besondere Übung von dem des Steinbrandes unterscheiden lassen.

Noch überraschender ist die Tatsache, daß auch die Hyphen von *Helminthosporium gramineum* auf diesen Nährböden am 4. bis 5. Tag nach der Beimpfung zur Bildung von Fortpflanzungskörpern schreiten, die den Konidien äußerst ähnlich, wenn nicht gar solche sind. Im Gegen-



Helminthosporium am 4. Tage nach der Konidienaussaat. Vergr. etwa 400fach.

Abb. 1. Einige auf dem neuen Nährboden auftretende Wuchsformen (halbschematisch.)

satz zu den Brandpilzen sind diese Gebilde länglichoval und stehen nicht in Ketten, sondern sitzen zu kleinen Haufen endständig an den Hyphenzweigen (vgl. Abb. 1b).

Die morphologischen und genetischen Zusammenhänge dieser Erscheinungen sind noch nicht restlos geklärt und werden zur Zeit untersucht.

Bei der zusammenfassenden Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse fällt auch noch die Tatsache auf, daß bei einer Zusammensetzung, wie sie der neue Nährboden aufweist, die Keimung der *Tilletia*-Sporen sich *trotz* Anwesenheit von 2 % Traubenzucker so rasch vollzieht. Wie *von Tubeuf* (1901), *Hollrung* (1925), *Rabien* (1928) u. a. berichten, unterbleibt nämlich die Keimung der *Tilletia*-Sporen auf Traubenzuckerlösung oder ist stark gehemmt. Auch finden sich in der Literatur verschiedentlich Angaben, wonach die Höchsttemperatur, bei der keine Keimung der Brandsporen mehr auftritt — im Gegensatz zu meinen Beobachtungen —, um 25° C liegt (z. B. *Hahne*, 1925, fand ein Keimungsoptimum bei 16 bis 18° C und das Maximum bei 20 bis 21°). Allerdings konnte auch *Rabien* (1928) durch Zusatz von Kaliumpermanganat zu seiner Calciumnitrat-Nährlösung das Maximum nach oben verschieben (über 25°), welche Tatsache er als Sauerstoffwirkung ansprach.

Mit dieser Erklärung können wir in bezug auf den hier beschriebenen Nährboden nichts anfangen. Sein Einfluß auf die Brandpilz- und *Hel-*

minthosporium-Entwicklung dürfte vielmehr in der Gesamtwirkung seiner Bestandteile begründet sein, wobei sich Tierkohle und KOH in ihrer Wirkung zu unterstützen scheinen. Die Alkalität ist offenbar ebenso notwendig wie das K-Ion, denn bei der Verwendung von NaOH bleibt die Wirkung aus[1]. Wie aus den neueren Arbeiten hervorgeht, vermögen sowohl Tierkohle als auch Kaliumhydroxyd *keimungs*hemmende Stoffe unschädlich zu machen. Da sich nun die *Keimung* (im engeren Sinne) der Brandsporen schon in den gewöhnlichen Nährlösungen leicht vollzieht, die Pilze sich aber nicht in der Weise, wie es mit Hilfe des neuen Nährbodens gezeigt werden konnte, weiterentwickeln, so müssen wir annehmen, daß die Wirkung von Tierkohle und KOH hier auch auf der Adsorption von *entwicklungs*hemmenden Stoffen beruht.

Es ist anzunehmen, daß der hier beschriebene Pilznährboden geeignet ist, dem Mykologen ein wichtiges methodisches Hilfsmittel zu werden und ihm neue interessante Ausblicke auf morphologischem, genetischem und physiologischem Gebiet zu gewähren. Damit entspricht diese Kulturenplatte nicht nur den Forderungen der Praxis, sondern besitzt auch hohes wissenschaftliches Interesse.

Die Zusammensetzung des neuen Pilznährbodens.

(für *Ustilago avenae*, *U. hordei*, *T. tritici*, *Helminthosporium gramineum*).

I. *Agarlösung:* 1000 ccm dest. Wasser, 25 g Agar-Agar (wie üblich sterilisieren).

II. *Zusätze:* 250 g Hafer 1 Stunde in etwa 1500 ccm dest. Wasser kochen; Filtrat soll 250 ccm Extraktflüssigkeit sein; 20 g Traubenzucker (auf je 1000 ccm Agarlösung) kommt zum Haferextrakt; 10 g pulver. Tierkohle (auf je 1000 ccm Agarlösung) kommt zum Haferextrakt.

I. und II. mischen, 10 Minuten ins kochende Wasserbad, dann auf je 100 ccm dieses Gemisches *0,6 g Kaliumhydroxyd* hinzufügen. Vor dem Gießen der Platten nochmals 2 Minuten in kochendes Wasser stellen.

Die vorstehenden Versuche wurden in der Zeit vom Juni bis November 1939 im Biologischen Versuchslaboratorium der Maschinenfabrik *Arthur Vondran*, Halle a. d. S., Abteilung Desinfektionsgeräte, durchgeführt. — Herrn Prof. Dr. *Fuchs* vom Pflanzenpathologischen Institut, Halle a. d. S. danke ich hiermit für die Vermittlung des Sporenmaterials und für seine stets freundlichen und bereitwilligen Belehrungen.

Literatur.

Borriss, H., Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **54**, 472, 1936. — *Boss, G.*, Planta **8**, 597, 1927. — *Hahne, J.*, Arb. a. d. landw. Instituten d. Univ. Halle **9**, 157, 1925. — *Hollrung, M.*, ebenda **9**, 79, 1925. — *Keil, J.*, Jahrb. wiss. Bot. **88**, 345, 1939. — *Laibach, F.* u. *J. Keil*, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **55**, 579, 1937. — *Rabien, H.*, Arb. d. Biol. Reichsanst. **15**, 297, 1928. — *Thren, R.*, Zeitschr. f. Bot. **31**, 337, 1937. — *Tubeuf, C. von*, Mittlg. d. Biol. Reichsanst. **2**, 179, 1901.

[1] D. h. das Pilzwachstum ist stark verzögert und zeigt Entartungserscheinungen.

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Deutschen Karls-Universität in Prag.)

Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß von Wirkstoffen auf die Vermehrung einiger mixotropher Algen.

Von

Karl Ondratschek (Prag).

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 7. Februar 1940).

Die Frage nach dem Einfluß von Wirkstoffen auf die Vermehrungsrate bei heterotroph sich ernährenden Mikroorganismen fand namentlich im letzten Jahrzehnt stärkere Beachtung. Zahlreiche Autoren, von denen *Kögl*, *Schopfer*, *Nielsen*, *Hartelius* und *Lwoff* genannt sein mögen, haben die vorliegende Frage in zahlreichen Arbeiten eingehend untersucht und der Klärung näher gebracht. Die auf dem hier behandelten Gebiete der Wirkstoffrage vorliegenden Arbeiten und Ergebnisse sind jüngst von *A. Janke* (1939) und *W. H. Schopfer* (1939) in so übersichtlicher Weise zusammengestellt und besprochen worden, daß sich ein näheres Eingehen an dieser Stelle erübrigt.

Der Einfluß dieser Stoffe auf die Vermehrung farbstoffführender, vor allem grün gefärbter Mikroorganismen (Algen) ist wenig untersucht worden, so daß wir heute nicht einmal die Frage beantworten können, ob diese Organismen überhaupt eines Wuchsstoffes bedürfen.

Die mit der vorliegenden Mitteilung begonnenen Untersuchungen stellen sich zur Aufgabe, die Ernährung bestimmter *Algen* und *Flagellaten* unter Berücksichtigung der Wirkstoffrage zu studieren. Es wird mit der Analyse des Einflusses von Wirkstoffen wie Ascorbinsäure (C-Vitamin) und Aneurin (Vitamin B_1) auf die Vermehrung mixotropher Algen als der grundsätzlich wichtigsten Frage begonnen. Im Anschluß daran soll die Untersuchung der Kohlenstoff- und Stickstoffernährung dieser Organismen erfolgen. Weitere Arbeiten werden sich mit der Ernährung obligat heterotropher und obligat autotropher Algen und Flagellaten zu beschäftigen haben und endlich soll zwischen diesen beiden Ernährungsarten ein Vergleich gezogen werden.

In der vorliegenden Mitteilung soll der Begriff „mixotrophe Organismen" im weitesten Sinne gefaßt sein. Wir wollen darunter alle jene Formen zusammenfassen, die imstande sind, in einer Nährlösung mit organischer C- und N-Quelle im Dunkeln und am Licht, mit CO_2 und Nitrat- oder Ammonstickstoff am Licht zu gedeihen.

Versuchsanstellung.

Die Versuche zwecks Ermittlung des Wuchsstoffeinflusses wurden zum Großteil in Röhrchen aus Jenaer Glas Nr. 20 in 10 ccm Lösung durchgeführt, nur die Versuche zur quantitativen Erfassung der Wuchsstoffwirkung wurden in 500 ccm Lösung in *Erlenmeyer*-Kolben aus dem gleichen Glas angesetzt.

Zur Bereitung der Nährlösungen, deren Zusammensetzung in den betreffenden Abschnitten angegeben wird, wurde doppelt — das zweite Mal durch ein Quarzrohr — destilliertes Wasser verwendet. Die chemischen Präparate sind pro analysi oder gleichwertige Erzeugnisse der Firmen: *Merck, Kahlbaum, Schuchardt, Fränkel* und *Landau*, die Vitamine und Organextrakte wurden von *Merck, I. G. Farben („Bayer")*[1], *Hoffmann-La Roche* und *Organon* bezogen.

Sterilisation erfolgte in der üblichen Weise durch kurzes Erhitzen des vollständigen Lösungsgemisches einschließlich Wuchsstoff auf 120° im Autoklaven.

Die Beimpfung der Versuchslösungen geschah mit einem Tropfen einer derart verdünnten, bakterienfreien Aufschwemmung von Zellgemischen, daß sich 10 bis 30 Zellen im Tropfen befanden, eine Zahl, die, gemessen am Ernteertrag, wegen ihrer Kleinheit bei der zahlen- oder gewichtsmäßigen Feststellung der Ernteerträge vernachlässigt werden kann.

Die untersuchten Organismen wurden der Kulturensammlung unseres Instituts entnommen. Zur Beimpfung mußte nach früheren Untersuchungen und grundsätzlichen Überlegungen (*Czurda*, 1935) tunlichst Zellgemische im Normalzustand verwendet werden (= Zellgemische von größter Einheitlichkeit bei intensivster Vermehrung), da nur in diesem Falle eine Gewähr für die Erzielung wiederholbarer Ergebnisse geboten ist.

Um dieser Forderung nach Möglichkeit gerecht zu werden, ohne erst eigene, langwierige Untersuchungen über die Variabilität anstellen zu müssen, wurde folgendermaßen vorgegangen. Aus eigener Erfahrung war bekannt, in welcher Nährlösung die verwendeten Organismen am besten zu gedeihen vermögen. Diese Lösung wurde beimpft und nach einiger Zeit, wenn reichlich Vermehrung eingetreten war, ein Teil des Zellgemisches wieder in eine Lösung gleicher Zusammensetzung übertragen. Nach vier bis fünf Wiederholungen war das Zellgemisch innerhalb der ersten 8 Tage (von der letzten Überimpfung an gerechnet) weitgehend morphologisch homogen und vermehrte sich üppig. Vor der Beimpfung einer Versuchsreihe wurde das Impfmaterial, soweit dies die besonderen Versuchsbedingungen erlaubten, mindest eine Passage in der Versuchslösung, natürlich ohne den zu prüfenden Wuchsstoffzusatz, „angewöhnt".

Die beimpften Röhrchen wurden zum Teil an einer „künstlichen Sonne" belichtet, zum Teil in einem Thermostaten bei 25° C dunkel gehalten. Nach Ablauf der meist zehntägigen Versuchsdauer wurde das Zellmaterial mikroskopiert und der Ernteertrag bestimmt.

Dazu wurden folgende Arbeitsverfahren angewendet. Bei den Versuchen in Röhrchen wurde der Ernteertrag bei einzelligen, nicht fadenbildenden Organismen durch Bestimmung der Zellzahl in cmm mittels einer

[1] Den I. G. Farbenwerken, bzw. deren Prager wissenschaftlichen Vertretung, danke ich auch an dieser Stelle bestens für die mir zur Verfügung gestellten Vitamin- und Organpräparate.

Zeiss-Thoma-Zählkammer festgestellt. Vor der Zählung wurden die Röhrchen kräftig durchgeschüttelt, um eine gleichmäßige Verteilung der Organismen zu erzielen. Von jedem Versuche wurden drei Röhrchen angesetzt, in jedem Röhrchen zehn Einzelzählungen durchgeführt und aus allen das arithmetische Mittel gezogen. Bei Verwendung fadenförmiger Algen wurde im Vorversuch der Ernteertrag nur geschätzt.

Nephelometrische Bestimmungen, wie sie von anderen Autoren bei verschiedenen Organismen häufig angewendet werden, kommen bei stärke- oder paramylonbildenden Organismen zur Ernteermittlung nicht in Betracht, da der Trübungsgrad einer Organismenaufschwemmung wesentlich durch den Reservestoffgehalt der Zellen bestimmt wird und nicht nur von der Anzahl der Zellen in der Volumeneinheit.

Bei den quantitativen Versuchen in größerer Flüssigkeitsmenge wurde außer der genannten Zählung auch das Trockengewicht bestimmt. Zu diesem Zwecke wurde die Algenaufschwemmung durch einen Gooch-Tiegel mit einer feinporigen Glasfilterplatte filtriert, der Tiegel bei 105° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen.

In einer Reihe von Versuchen wurde auch das Gesamtvolumen und das Frischgewicht des Ernteertrages festgestellt; die bekannte Unbrauchbarkeit dieser Werte hat sich auch hier wiederum erwiesen, so daß im weiteren die Werte solcher Bestimmungen nicht wiedergegeben werden.

Eigene Untersuchungen und ihre Ergebnisse.

A. Untersuchungen an Haematococcus pluvialis.

1. Prüfung verschiedener Nährlösungen auf ihre Eignung zur Züchtung.

Als Untersuchungsobjekt für die einleitenden Versuche wurde *Haematococcus pluvialis* gewählt, eine Alge, die hinsichtlich ihrer Ernährung schon öfters untersucht worden ist, u. a. von *Pringsheim* (1914) und *Lwoff* (1932).

Da diese Untersuchungen zu einer Zeit geschahen, in welcher man das Ernährungsproblem der Mikroorganismen von einem wesentlich anderen Standpunkt aus betrachtete, als dies heute geschieht, erschien es angebracht, die folgenden Versuche durchzuführen. Zur Feststellung, inwieweit *Haematococcus pluvialis* den von mir geforderten Bedingungen entspricht, also die Fähigkeit besitzt, seinen Kohlenstoff- und Stickstoffbedarf aus anorganischen oder organischen Substanzen, wie auch aus beiden zugleich bestreiten zu können, wurde die Zellzunahme in folgenden Nährlösungen ermittelt:

I. *Mineralsalzlösung:* KNO_3 0,01 %, K_2HPO_4 0,001 %, $MgSO_4$ 0,001 %, $CaCl_2$ 0,001 %, $FeSO_4$ 0,0001 %; $p_H = 6,5$.

II. *Die gleiche Lösung wie I.* Durch Zusatz von NaOH auf $p_H = 7,2$ gebracht.

III. *Erdabkochung.* 1 : 5, mit einem p_H von 6,6.

IV. *Flagellatennährlösung.* Pepton Vaillant 0,1 %, Na-Acetat 0,2 %; mit Essigsäure auf $p_H = 6,3$ gebracht.

V. *Die gleiche Lösung wie IV.* Durch Zusatz von NaOH auf $p_H = 7,6$ eingestellt.

Sämtliche p_H-Bestimmungen wurden kurz vor der Beimpfung durchgeführt.

Die Versuchsröhrchen kamen teils ans Licht, teils ins Dunkle. Nach 10 Tagen wurde die Zellenzahl im cmm bestimmt und eine zweite, nach weiteren 10 Tagen eine dritte Passage durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle I zusammengestellt.

Tabelle I. Kultur von *Haematococcus pluvialis* in verschiedenen Nährlösungen.

Nährlösungen	p_H	Anzahl der Zellen je cmm					
		Züchtung					
		im Licht			im Dunkeln		
		Passagen					
		1.	2.	3.	1.	2.	3.
I. Lösung anorganischer Salze	6,5	400	650	580	–	—	–
II. „ „ „	7,2	800	1200	1400	–	—	–
III. Erdabkochung	6,6	900	1200	1200	·	–	–
IV. Flagellatennährlösung	6,3	250	200	100	150	50	50
V. „	7.6	1400	1600	2400	800	1400	1200

Damit sind die früheren Ergebnisse (*Pringsheim*, 1914, *Lwoff*, 1932), daß sich *Haematococcus pluvialis* sowohl in einer Mineralsalznährlösung am Licht, als auch in einer Lösung mit organischer C- und N-Quelle im Licht und im Dunkeln zu vermehren vermag, bestätigt. Ebenso zeigt sich wieder, daß eine Nährlösung aus organischen Stoffen in jedem Falle eine größere Erntemenge liefert als eine reine Mineralsalzlösung. Im Erddekokt und im Pepton Vaillant sind, wie schon für Erddekokt gezeigt (*Pringsheim*, 1936) und für das genannte Pepton auch im hiesigen Institut wiederholt nachgewiesen wurde, Wuchsstoffe enthalten. Wir sehen somit aus dem Versuchsergebnis, daß die im Erddekokt und Pepton Vaillant enthaltenen Wuchsstoffe wohl auch auf unser Versuchsobjekt einen günstigen Einfluß haben, doch ist die Wirkung hier zum Teil verdeckt. Die obigen Ergebnisse lassen weiter erkennen, daß *Haematococcus* eine Reaktion zwischen p_H 7,2 und 7,6 bevorzugt. Deshalb mußte bei den folgenden Versuchen bei der Zubereitung der Nährlösungen darauf Rücksicht genommen werden. In einer Lösung organischer Stoffe erweist sich die Reaktion von p_H 6,3 als zu sauer. In Mineralsalzlösung vermehrt sich das Versuchsobjekt bei dieser Reaktion zwar, doch ist der Ernteertrag bei einer Anfangsreaktion von p_H 7,2 weit größer.

2. *Feststellung des Einflusses von Wirkstoffen auf die Vermehrung von Haematococcus pluvialis.*

Zunächst war festzustellen, ob die hier zu prüfenden Substanzen (Vitamine, Hormone und Organextrakte) überhaupt eine stimulierende

Wirkung ausüben. Zu diesem Zwecke wurde ein in reger Vermehrung stehendes Zellgemisch von *Haematococcus pluvialis* in die folgenden Nährlösungen geimpft und darin durch fünf Passagen von je 10 Tagen Dauer gezogen. Als „Grundlösung" soll stets die folgende Mineralsalzlösung bezeichnet werden:

Grundlösung. K_2HPO_4 0,001 %, $MgSO_4$ 0,001 %, $CaCl_2$ 0,001 %, $FeSO_4$ 0,0001 %. — Diese wird variiert in:

Lösung a, anorganische N-Quelle allein: Grundlösung mit 0,1 % KNO_3 (Tabelle II);

Lösung b, anorganische N-Quelle neben organischer C-Quelle: Grundlösung mit 0,1 % KNO_3 und 0,2 % Na-Acetat (Tabelle III);

Lösung c, organische N-Verbindung: Grundlösung mit 0,1 % Asparagin (Tabelle IV);

Lösung d, organische N-Verbindung nebst einer organischen C-Quelle: Grundlösung mit 0,1 % Asparagin und 0,2 % Na-Acetat (Tabelle V).

Jeder der unter a) bis d) angegebenen Lösungen wurde schließlich Vitamin B_1 (Aneurin) oder Vitamin C (Ascorbinsäure) in einer Konzentration von 0,001 %, bzw. Hormone oder Organextrakte zugesetzt. Die letztgenannten standen nur in bereits standardisierten Lösungen zur Verfügung, von denen jeweils 0,001 Vol.-% zugesetzt wurden. Jede der Versuchslösungen wurde auch ohne Wirkstoffzusatz zur Kontrolle beimpft.

Eine Gruppe von Versuchen kam ans Licht, eine andere, ebensolche Gruppe, ins Dunkle. Der Ernteertrag der einzelnen Kulturen ist in den Tabellen II bis V zusammengestellt.

Aus der Tabelle II ergibt sich folgendes: Bei ausschließlich anorganischer Ernährung macht sich eine vielleicht nicht erwartete Wirkung von Ascorbinsäure bemerkbar. Dieser Stoff fördert die Vermehrung beträchtlich, der Ernteertrag steigt gegenüber der Kontrolle auf das 9,5fache. Die Wirkung von Aneurin bleibt demgegenüber etwas zurück (6,5fache Erntemenge). *Nielsen* hatte 1937 in tierischer Leber Wuchsstoffe, die teilungsanregend auf *Hefen* wirken, nachgewiesen. Wir können mit Recht vermuten, daß sich in dem von uns verwendeten Leberextrakt („Pernemon") Wuchsstoffe vorfinden werden; es war jedoch völlig ungewiß, ob diese Wuchsstoffe auf unseren Organismus anregend wirken werden. Die vorliegenden Versuche zeigen, daß sogar bei rein mineralischer Ernährungsweise die Wuchsstoffe des Leberextraktes eine starke Steigerung der Vermehrungsintensität hervorrufen, stärker noch als Aneurin. Die ebenfalls versuchten Hormonpräparate hingegen haben keine fördernde, sondern eine deutlich hemmende Wirkung gezeigt.

Haben wir neben den anorganischen Stoffen ergänzend noch eine *organische Kohlenstoffquelle* (Natriumacetat) geboten (s. Tabelle III),

Tabelle II. *Haematococcus pluvialis* in Mineralsalzgrundlösung mit 0,1 % KNO_3.

Wirkstoff in einer Konzentration von 0,001 %	p_H	Anzahl der Zellen je cmm									
		Lichtkulturen					Dunkelkulturen				
		Passagen									
		1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.
Ohne Zusatz, Kontrolle	6,9	250	300	200	350	400	—	—	—	—	—
Aneurin	7,1	600	650	800	1200	1200	—	—	—	—	—
Ascorbinsäure	6,9	1800	2000	1800	3200	3800	—	—	—	—	—
Pernemon	7,1	1100	1200	2500	2000	2600	—	—	—	—	—
Cortin	6,5	400	450	400	250	350	—	—	—	—	—
Adrenalin	6,7	200	300	200	200	300	—	—	—	—	—
Thyroxin	6,9	50	70	50	100	120	—	—	—	—	—
Insulin	6,7	100	150	100	100	130	—	—	—	—	—
Preloban	7,1	250	250	200	250	280	—	—	—	—	—
Prolan	6,9	100	70	110	100	100	—	—	—	—	—
Testikelhormon	6,9	50	50	30	70	50	—	—	—	—	—
Follikelhormon	6,7	150	200	150	150	100	—	—	—	—	—

Tabelle III. *Haematococcus pluvialis* in Mineralsalzgrundlösung mit 0,1 % KNO_3 und 0,2 % Na-Acetat.

Wirkstoff	p_H	Anzahl der Zellen je cmm									
		Lichtkulturen					Dunkelkulturen				
		Passagen									
		1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.
Ohne Zusatz, Kontrolle	6,7	100	200	250	100	150	25	10	—	—	—
Aneurin	6,9	400	1000	1200	1000	1500	200	400	500	400	700
Ascorbinsäure	6,5	900	1500	1800	2800	3400	800	1600	2000	2200	2600
Pernemon	6,7	2400	2000	2500	2600	2400	700	600	1200	1200	1400
Cortin	6,9	300	250	400	250	300	150	200	300	250	300
Adrenalin	6,5	100	150	50	150	100	50	70	100	70	60
Thyroxin	6,9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Insulin	6,9	50	50	80	20	20	80	60	100	50	20
Preloban	6,5	100	150	200	100	150	100	160	100	150	100
Prolan	6,7	150	200	100	150	150	100	200	180	100	150
Testikelhormon	6,9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Follikelhormon	7,1	50	80	150	80	180	—	—	—	—	—

so zeigen die *Lichtversuche* im großen und ganzen die gleichen Ernteerträge wie die Mineralsalzlösung allein. Der Acetatzusatz fördert nicht den, gegebenenfalls in einer Vermehrungssteigerung zum Ausdruck kommenden, Kohlenstoffgewinn. Die Wirkung von Ascorbinsäure und Aneurin ist völlig gleich jener in rein anorganischer Salzlösung. Die hingegen im *Dunkeln* gehaltenen Versuche zeigen eine Ausnutzung des Nitratstickstoffs und des Acetatkohlenstoffs, was in einer beträcht-

Tabelle IV. *Haematococcus pluvialis* in Mineralsalzgrundlösung mit 0,1% Asparagin.

Wirkstoffe	p_H	Anzahl der Zellen je cmm									
		Lichtkulturen					Dunkelkulturen				
		Passagen									
		1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.
Ohne Zusatz, Kontrolle	6,9	200	400	500	400	300	—	—	—	—	—
Aneurin	6,7	700	900	700	700	900	—	—	—	—	—
Ascorbinsäure	7,1	2800	3500	3000	3300	3600	—	—	—	—	—
Pernemon	6,8	2000	1600	2200	2400	2800	—	—	—	—	—
Cortin	6,5	100	150	150	100	150	—	—	—	—	—
Adrenalin	6,7	80	100	50	100	100	—	—	—	—	—
Thyroxin	7,1	50	50	20	—	—	—	—	—	—	—
Insulin	6,9	100	150	100	160	100	—	—	—	—	—
Preloban	7,0	150	80	100	100	150	—	—	—	—	—
Prolan	6,9	100	150	100	150	150	—	—	—	—	—
Testikelhormon	7,3	80	50	100	80	50	—	—	—	—	—
Follikelhormon	7,1	150	180	120	150	100	—	—	—	—	—

Tabelle V. *Haematococcus pluvialis* in Mineralsalzgrundlösung mit 0,1% Asparagin und 0,2% Na-Acetat.

Wirkstoffe	p_H	Anzahl der Zellen je cmm									
		Lichtkulturen					Dunkelkulturen				
		Passagen									
		1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.
Ohne Zusatz, Kontrolle	6,8	600	700	500	700	600	80	100	180	100	150
Aneurin	6,9	2800	3600	3200	3900	4000	3200	3800	4700	4900	5000
Ascorbinsäure	6,5	3200	3900	3100	3900	4500	1800	1600	1900	2300	2000
Pernemon	6,9	2600	2900	3600	3200	3500	2800	3200	3600	3500	3700
Cortin	7,1	300	250	300	300	350	200	150	250	200	250
Adrenalin	7,3	150	150	100	200	200	150	100	150	100	100
Thyroxin	6,9	200	300	200	250	200	100	80	200	180	150
Insulin	6,7	150	100	150	100	150	100	100	100	150	100
Preloban	7,1	100	50	80	100	100	80	100	70	50	80
Prolan	6,9	100	150	100	150	100	100	80	100	80	90
Testikelhormon	7,3	100	100	150	100	100	80	100	80	120	100
Follikelhormon	7,1	150	100	80	100	100	150	150	100	80	150

lichen Zellvermehrung zum Ausdruck kommt. Namentlich die Ascorbinsäure zeigt diese Wirkung.

Haematococcus pluvialis ist auch bei Darbietung von organischem Stickstoff (Asparagin) und Vitamin nicht imstande, sich im Dunkeln zu vermehren (s. Tabelle IV), obwohl Aneurin, Ascorbinsäure und der Leberextrakt im Lichte eine Förderung bewirken.

Wird hingegen das Asparagin mit Acetat zusammen geboten (siehe Tabelle V), so sind die Vitamine und der Leberextrakt imstande, auch

im Dunkeln im großen und ganzen den gleichen Ernteertrag herbeizuführen, wie in den entsprechenden Lichtversuchen.

Aus der ganzen Versuchsreihe ist zu ersehen daß eine zur autotrophen wie heterotrophen Ernährungsweise befähigte Alge zur heterotrophen Ernährung gezwungen, ähnlich wie ein obligat heterotropher Organismus auf Aneurin sehr gut anspricht, daß wir aber auch bei autotropher Züchtung in der Ascorbinsäure ein vermehrungsförderndes Vitamin besitzen. Etwas verwischt wird dieser einfache Zusammenhang allerdings dadurch, daß in den Fällen, in denen Ascorbinsäure bei ausschließlich organischer und Aneurin bei vollständig anorganischer Ernährungsweise beigefügt wurde, ebenfalls eine Ertragssteigerung, wenn auch in geringerem Maße, festzustellen war.

Was die Wirkung des Leberextraktes betrifft, sei hier auf *Hartelius* und *Hjorth-Hansen* (1936) verwiesen, die u. a. in Leberextrakten Wuchsstoff B nachweisen konnten. Ob nun eine Beziehung zu diesen Ergebnissen besteht oder ob in unserem Falle andere Bestandteile des Leberextraktes einen Einfluß nehmen, kann hier nicht entschieden werden. Eine solche ist auch hier nicht von Bedeutung, da vor allem die Wirkung der Vitamine untersucht werden soll.

Die ausgebliebenen Erfolge mit Hormonen decken sich mit den Ergebnissen von *Lund* (1936), der die Wirkung des Follikelhormons auf das Wachstum einiger *Pilze* untersuchte und auch bei ihnen keinen Erfolg feststellen konnte.

3. *Watte als mögliche Wuchsstoffquelle.*

W. H. Schopfer hat 1937 in einer sehr eingehenden Arbeit mehrere Wattesorten auf verschiedene Art vorbehandelt und auf ihre Wirkung als Wuchsstoffquelle hin untersucht. Die Ergebnisse sind von größter praktischer Bedeutung, denn es zeigte sich, daß z. B. die gewöhnliche, nicht gebleichte Watte, wie sie bei uns und in anderen mikrobiologischen Laboratorien für den Gefäßverschluß oft in Verwendung steht, beim Sterilisieren erhebliche Mengen von Wuchsstoff an die Lösung abgibt, und zwar so viel, daß nahezu die gleiche Wirkung erzielt wird, wie bei Zugabe von geringen Mengen B_1-Vitamin.

Da wir sicher nicht die gleichen Wattesorten zur Verwendung haben, wie sie *Schopfer* zur Verfügung standen, war es notwendig, unsere Sorten zu untersuchen. Es wurde hier die Untersuchung auf zwei Sorten beschränkt, nämlich auf die in unserem Institut verwendete rohe, nicht entfettete, leicht braune Watte und auf eine entfettete und gebleichte Sorte, wie sie für medizinische Zwecke in Gebrauch steht. Beides sind Erzeugnisse der Firma *Kleining*, Hohenelbe, Sudetengau.

Die Versuchsanstellung zur Prüfung der Watte auf einen möglichen Wuchsstoffgehalt war einfach. Röhrchen mit Mineralsalznährlösung wurden

teilweise mit Stöpsel der beiden Wattesorten versehen, teilweise kamen kleine Watteflöckchen außerdem unmittelbar in die Lösung. Die Versuchsanordnung entspricht dem, was normalerweise beim Versuch gegeben ist, nämlich Watte als Röhrchenverschluß, aus dem bei der Sterilisation durch den Dampf etwas herausgelöst werden kann, und aus dem leicht beim Einsetzen des Wattestöpsels in das Röhrchen kleine Wattefasern ungewollt in die Lösung fallen. Zur Kontrolle wurden einige Röhrchen mit Glaskappen bedeckt und alle Röhrchen im Autoklaven bei 120° C sterilisiert. Nach dem Erkalten wurde die Beimpfung mit der üblichen Menge einer Aufschwemmung von *Haematococcus pluvialis* vorgenommen.

Nach 10 Tagen bot sich das in Tabelle VI festgehaltene Bild. Die rohe, nicht entfettete Watte liefert demnach schon bei üblicher Verwendung, durch den Sterilisationsvorgang soviel vermehrungsanregende Substanz an die Versuchslösung, daß das Versuchsergebnis beeinflußt werden könnte. Die reine, gebleichte Watte für medizinische Zwecke verhält sich ganz anders, sie gibt keine, die Vermehrung fördernde Stoffe ab.

Tabelle VI. Watte als Wuchsstoffquelle für *Haematococcus pluvialis*.

	Anzahl der Zellen je cmm				
	Röhrchen Nr.				Durchschnitt
	1	2	3	4	
Rohe Watte als Stöpsel	1000	1200	850	950	1000
Rohe Watte, 1 Flocke in der Lösung	1800	1600	2000	900	1575
Medizinische Watte als Stöpsel	550	350	400	450	437
Medizinische Watte, 1 Flocke in der Lösung	350	400	300	450	375
Glaskappe als Verschluß	450	350	400	500	425
Dasselbe + 0,001 % Ascorbinsäure	2000	2800	2400	3000	2550

Für die weiteren Versuche konnte daher die rohe, nicht entfettete Watte als Röhrchenverschluß nicht in Betracht kommen. Da sich in den obigen Versuchen ein Verschluß mit medizinischer Watte ebenso brauchbar erwies wie ein solcher mittels übergreifender Glaskappe, soll in allen folgenden Versuchen ausschließlich diese reine, medizinische Watte verwendet werden, da ihr Gebrauch größere Sicherheit bezüglich Sterilität bedingt als ein Glaskappenverschluß.

4. *Untersuchung der Hitzebeständigkeit wässeriger Vitaminlösungen.*

Im Zuge der Vorversuche mußte auch die Hitzebeständigkeit wässeriger Vitaminlösungen einer näheren Untersuchung unterworfen werden.

Die Sterilisation mittels des Autoklaven, wie sie bei mikrobiologischen Arbeiten gebräuchlich ist, darf nicht ohne Vorbehalt für Lösungen

mit Vitaminzusätzen verwendet werden, da diese nicht absolut temperaturbeständig sind. Die Beständigkeit wird dabei von verschiedenen Faktoren, wie Wasserstoffionenkonzentration, Sauerstoffgegenwart u. a. m. beeinflußt. Näher soll auf diesen Punkt nicht eingegangen werden, Angaben sind aus der einschlägigen Literatur zu entnehmen, in welcher allerdings fast immer Verhältnisse wiedergegeben werden, die sich auf den Tiertest beziehen. Daß diese Angaben nicht ohne weiteres auf unsere Mikroorganismen übertragen werden dürfen, wiesen *Schopfer* und *Blumer* (1938) u. a. nach. Das Wirkungsvermögen von Aneurin gegenüber *Pilzen* geht nicht in der gleichen Weise beim Erhitzen verloren, wie gegenüber von Tieren. Es bedurfte daher eigener Versuche, um für unseren Zweck zu prüfen, wie weit die Sterilisation (kurzes Erhitzen auf 120°) die Wirksamkeit der Wuchsstoffe beeinflußt.

Man könnte auch daran denken, durch Filtration durch ein Seitz-Filter die Lösungen keimfrei zu machen, jedoch muß diese Methode von vornherein abgelehnt werden, da bekannt ist, daß diese Filter durch ein hohes Adsorptionsvermögen, namentlich gegenüber Vitaminen, ausgezeichnet sind.

In einer Zusammenstellung von *W. Grabe* (1937) findet sich die Angabe, daß Vitamin B_1 in saurer Lösung hitzebeständig ist, durch Alkalien rasch zersetzt wird. Vitamin C ist kochbeständig, nur während längerem Stehenlassen in wässeriger Lösung gegen Sauerstoff empfindlich. Diese Angaben genügen für die vorliegenden Untersuchungen nicht. Es wurden daher folgende Versuche angestellt.

Die Grundlösung mit 0,1 % KNO_3 bzw. 0,1 % Asparagin, zum Teil auch mit 0,2 % Natriumacetat, wurde einmal für sich sterilisiert, dann mit Vitaminen gemeinsam. Zum ersteren Teil wurden nach der Sterilisation der Grundlösung sterile Vitaminlösung zugesetzt. Außerdem blieben von jeder Lösung einige Röhrchen ohne Vitaminzusatz; sie stellen die Kontrollen dar.

Die verschiedenen Kombinationen von anorganischer und organischer Stickstoffquelle mit und ohne Acetatzusatz wurden deshalb gewählt, weil möglicherweise die Beständigkeit der Vitamine in verschieden zusammengesetzten Lösungen verschieden sein könnte. Die Beurteilung erfolgte wiederum durch Bestimmung der Zellzahl in cmm nach zehntägiger Versuchsdauer.

Nach Beendigung der Versuchsreihe zeigte sich folgendes Bild (Tabelle VII). Es ist demnach kein Unterschied in der Vermehrung festzustellen, gleichgültig, ob das Vitamin mit der Lösung zusammen sterilisiert, oder nachträglich zugesetzt wurde. In den folgenden Versuchsreihen wird der Einfachheit halber das Vitamin stets mit der Lösung zusammen sterilisiert.

Tabelle VII. Einfluß der Sterilisation auf die Wirksamkeit der Vitamine bei *Haematococcus pluvialis*.

		Anzahl der Zellen je cmm							
		KNO_3				Asparagin			
		ohne Acetat		mit Acetat		ohne Acetat		mit Acetat	
		im Licht	im Dunkeln	im Licht	im Dunkeln	im Licht	im Dunkeln	im Licht	im Dunkeln
Ohne Vitaminzusatz....		350	—	250	20	300	—	500	100
B_1-Vitamin	mit der Lösung sterilisiert	700	—	1500	800	1000	—	3800	3900
	getrennt sterilisiert	850	—	1300	700	900	—	3600	4000
C-Vitamin	mit der Lösung sterilisiert	2800	—	3400	1700	4000	—	4200	2100
	getrennt sterilisiert	2700	—	3500	1600	4000	—	4000	1700
Leberextrakt	mit der Lösung sterilisiert	2000	—	2400	1600	2800	—	2900	3200
	getrennt sterilisiert	2200	—	2600	1300	2300	—	3400	3800

5. *Feststellung der am stärksten wirkenden und der eben noch wirksamen Vitaminkonzentration.*

Ausgehend von den in den Versuchsreihen II bis IV gemachten Erfahrungen wurden nun folgende Kombinationen der Nährlösung geprüft. Zur Grundlösung kamen:

a) 0,1 % KNO_3 und C-Vitamin; Kultur am Licht.

b) 0,1 % Asparagin und 0,2 % Natriumacetat mit B_1- bzw. C-Vitamin; Züchtung im Licht.

c) Die gleiche Lösung wie b) mit B_1-Vitamin bei Züchtung im Dunkeln.

Die Vitamine wurden in Konzentrationen von 1 γ bis 100 mg auf je 100 ccm Lösung zugesetzt. Das Ergebnis ist in der Tabelle VIII zusammengefaßt.

Aus der Tabelle VIII läßt sich ersehen, daß das Optimum der Vitaminwirkung in der hier gewählten Konzentrationsabstufung ungefähr bei 1 bis 10 mg Vitamin auf 100 ccm Lösung liegt, sowohl für Aneurin, als auch für Ascorbinsäure. Eine größere Gabe des vermehrungsanregenden Stoffes verursacht das Absterben des eingetragenen Zellmaterials. Eine Feststellung der geringsten noch meßbaren Vitaminwirkung stößt auf Schwierigkeiten, da geringere Konzentrationen als

Tabelle VIII. Vermehrung von *Haematococcus pluvialis* bei verschiedenen Vitaminkonzentrationen.

	Anzahl der Zellen je cmm						
	Vitaminkonzentration						
	0	1 γ	10 γ	100 γ	1 mg	10 mg	100 mg
KNO_3 + C-Vitamin im Licht	300	300	800	2000	3500	3800	abgestorben
Asparagin + Acetat + C-Vitamin im Licht	500	500	1500	3300	4000	4200	„
+ B_1-Vitamin im Licht	100	100	100	1000	3800	abgestorben	„
mit B_1-Vitamin im Dunkeln	200	200	600	4000	4700	„	„

1 mg auf 100 ccm Lösung Ernteerträge liefern, die sich nicht wesentlich von den Kontrollversuchen ohne Zusatz eines Wirkstoffes unterscheiden. Rund 1 mg/100 ccm stellt die am besten wirkende Konzentration dar, 0,1 mg ist bei mixotropher Ernährung noch wirksam, namentlich bei Verwendung von Ascorbinsäure als Wuchsstoff, bei rein anorganischer Ernährungsweise schon schwach wirksam. 0,01 mg zeigt schon sehr spärliche Wirksamkeit. Für die folgenden Versuche scheint es zweckmäßig, stets 1 mg Vitamin für 100 ccm Lösung zu verwenden.

Auf die Folgerungen aus diesen, den bisherigen Befunden anderer Autoren nicht ganz entsprechenden Ergebnissen wird später, bei der Besprechung der Vitaminwirkung im allgemeinen zurückzukommen sein.

Mit den vorliegenden Befunden wurde nun ein wesentliches Problem berührt: Haben die untersuchten Wuchsstoffe lediglich einen stimulierenden Einfluß, d. h. steigern sie lediglich die Vermehrungsgeschwindigkeit, die auch ohne Wuchsstoffzusatz mehr oder minder groß ist, oder handelt es sich um Stoffe, die für Wachstum und Vermehrung absolut notwendig sind, so daß diese, wenn die Wirkstoffe in zu geringer Menge zugesetzt werden, ganz zum Stillstand kommen? Es scheint hier der gegebene Ort zu sein, um auf diese Frage einzugehen.

Es ist nun gar nicht so einfach, diese Frage zu beantworten, wie man beim Studium der einschlägigen Literatur vermuten könnte; auch meine bisherigen Versuche geben keine restlose und klare Antwort. Mit Ausnahme von *Schopfer* und seinen Mitarbeitern, die für gewisse *Mucorineen* und auch für *Ustilago violacea* das absolute Aneurinbedürfnis verläßlich nachgewiesen haben, finden wir meist nur Angaben (bei Organismen, die auf Wuchsstoffgaben positiv reagieren), daß ein Wuchsstoffzusatz zur Kulturflüssigkeit ertragssteigernd wirke, ohne daß aber durch besondere Versuche die *Notwendigkeit* dieser Stoffe nachgewiesen ist. Dabei wird deren Unentbehrlichkeit oft behauptet.

Aus den Ergebnissen des bisherigen Studiums der Wuchsstofffrage und auf Grund von Überlegungen ergeben sich folgende Möglichkeiten für die Wirksamkeit von Wuchsstoffen:

A. Der Organismus kann aus einer synthetischen Nährlösung, organischer oder anorganischer Zusammensetzung, die völlig frei von Wuchsstoffen ist, alle notwendigen Stoffe und in einer für gute Vermehrung ausreichenden Menge assimilieren; eine Wuchsstoffzufuhr steigert weder den Ertrag, noch das Wachstum der einzelnen Zellen.

B. Der Organismus kann zwar eine wuchsstoffreie Lösung organischer oder anorganischer Nährstoffe ausnutzen: der erzielte Ernteertrag ist jedoch mehr oder minder gering. Eine Wuchsstoffbeigabe zur Nährlösung steigert den Ertrag bzw. das Wachstum der einzelnen Zellen beträchtlich. Der Ernteertrag kann auf ein Vielfaches der Menge gesteigert werden, die ohne Wuchsstoff erzielt wird. Der Wuchsstoff spielt hier die Rolle einer anregenden Substanz.

C. Ohne Wuchsstoffzusatz kann eine synthetische Nährlösung nicht assimiliert werden, der Wuchsstoff ist hier grundsätzlich notwendig. Die Vermehrung hört auf — bei Verwendung kleinster Wuchsstoffmengen — wenn der Wuchsstoffvorrat verbraucht ist.

Der unter A besprochene Fall ist experimentell leicht feststellbar. Schwierig kann dagegen die Unterscheidung der unter B und C angegebenen Möglichkeiten werden. Zur restlosen Entscheidung bedarf es sehr eingehender Untersuchungen. Zwei Wege können dabei eingeschlagen werden: Erstens die Züchtung in einer peinlichst wuchsstofffrei bereiteten Lösung, zweitens — nach *N. Fries* (1938) — die Vornahme von „Wachstumsversuchen auf synthetischem Substrat mit Zusatz einer suboptimalen Wuchsstoffmenge". Das Wachstum des betreffenden Organismus hört dann entweder ganz auf, wenn die zugesetzte Wuchsstoffmenge erschöpft ist (siehe Punkt C), oder es ist weiteres Wachstum möglich, wenn auch mit geringerer Intensität (siehe Punkt B).

6. *Vitamine als Nährstoffquellen.*

Die eben erörterten Fragen legen den Gedanken nahe, ob die Vitamine in unseren Versuchen nicht vielleicht bloß als Nährstoffe ausgenutzt werden, und ob sich damit die bei Algen immer nötige, deutlich höhere Konzentration, als sie bei den verschiedensten Organismen gefunden wurde, erklären ließe. Zur Prüfung dieser Frage wurde die Grundlösung (S. 93) mit verschiedenen, in der Tabelle IX zusammengestellten Zusätzen in den üblichen Konzentrationen von KNO_3, Asparagin, Natriumacetat, Aneurin und Ascorbinsäure versetzt und als Versuchslösung verwendet. Die beiden Vitamine wurden in einer Konzentration von 0,01 % für C- und 0,001 % für B_1-Vitamin

Tabelle IX. Vitamine als Nährstoffquellen.

	Anzahl der Zellen je cmm											
	0,001 % Aneurin						0,01 % Ascorbinsäure					
	im Licht			im Dunkeln			im Licht			im Dunkeln		
	Passagen						Passagen					
	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.
0,1 % Asparagin und 0,2 % Na-Acetat ..	2800	3100	3000	4100	4200	4400	3400	3800	3800	1500	1600	1600
0,1 % Asparagin	2300	2400	2600	—	—	—	4000	3800	4000	—	—	—
0,2 % Na-Acetat	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Vitamin allein	1000	200	—	—	—	—	200	—	—	—	—	—
0,1 % KNO_3	·500	600	500	—	—	—	3800	3600	3700	—	—	—

zugesetzt, da höhere Konzentrationen bereits schädlich wirken, wie die Versuchsreihe V ergeben hat.

Das Vitamin B_1 ist als Kohlenstoffquelle ungeeignet, da es mit Asparagin im Dunkeln keine Vermehrung zuläßt. Als Stickstoffquelle ist es ebenso wenig geeignet; wohl findet in der ersten Passage im Lichte eine Vermehrung statt, diese dürfte sich aber auf Kosten der mitgebrachten Reservestoffe erklären lassen. In der zweiten Überimpfung ist die Vermehrung bereits ganz gering, während in der dritten Passage überhaupt keine mehr stattfindet. Ascorbinsäure ist gleichfalls als Kohlenstoffquelle im Dunkeln ungeeignet, als Stickstoffquelle kommt es infolge völliger Stickstoffreiheit überhaupt nicht in Betracht.

In gleicher Weise ermöglicht der in der Tabelle IX nicht besonders aufgeführte Leberextrakt für sich allein keine Vermehrung, weder im Dunkeln, noch am Lichte, auch bei Zusatz von Natriumacetat nicht.

7. *Über die zeitliche Verteilung der Wuchsstoffwirkung.*

Es könnte für das Verständnis der Wuchsstoffwirkung von Bedeutung sein, zu wissen, wie sich die Vitaminwirkung zeitlich äußert. Um diese Frage zu beantworten, wurden Versuchslösungen in größeren Kolben beimpft und von Zeit zu Zeit gründlich durchgemischt. Alle 2 Tage wurde aseptisch etwas Algenaufschwemmung entnommen und durchgezählt. Zur Verwendung gelangten zwei Nährlösungen:

a) Grundlösung mit 0,1 % KNO_3 im Lichte und

b) Grundlösung mit 0,1 % Asparagin und 0,2 % Natriumacetat am Licht und im Dunkeln.

Die Ergebnisse sind durch die folgenden Abb. 1 bis 3 wiedergegeben.

Die vorliegenden Befunde zeigen also, daß sich die Wuchsstoffwirkung innerhalb der ersten 10 Tage der Versuchsdauer in einer mehr oder weniger raschen Steigerung der Erntemenge äußert und am 8. bis

10. Tage ihren höchsten Wert erreicht. Im weiteren Verlauf der Kultur ist die Zellzahlzunahme nicht wesentlich anders als in den Kontrollkulturen ohne Wuchsstoffzusatz.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden die folgenden Versuche jeweils nach zehntägiger Kulturdauer abgebrochen und der Ernteertrag bestimmt, da eine längerwährende Züchtung keine wesentliche Zunahme der Zellzahl mehr verursachen konnte.

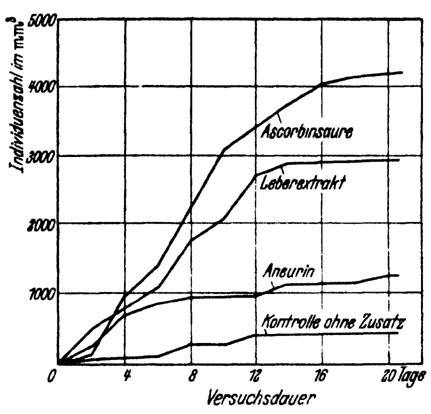


Abb. 1. *Haematococcus pluvialis*. Zeitliche Verteilung der Vitaminwirkung bei Züchtung in Mineralsalzlösung.

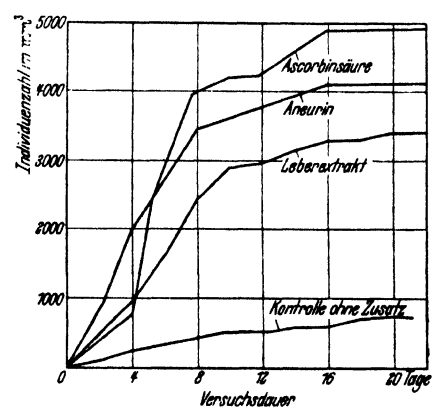


Abb. 2. *Haematococcus pluvialis*. Zeitliche Verteilung der Vitaminwirkung bei Züchtung in Mineralsalzlösung mit Asparagin- und Acetatzusatz am Licht.

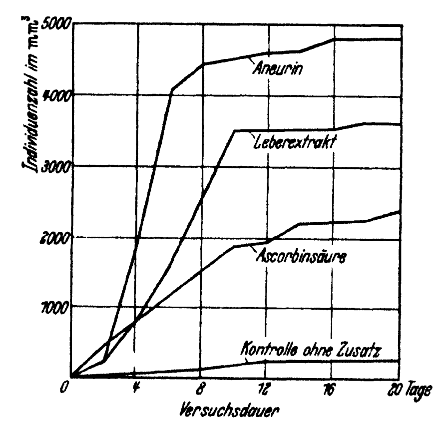


Abb. 3. *Haematococcus pluvialis*. Zeitliche Verteilung der Vitaminwirkung bei Züchtung in Mineralsalzlösung mit Asparagin- und Acetatzusatz im Dunkeln.

B. Untersuchungen an anderen Algen und Flagellaten.

1. *Auswahl geeigneter Stämme.*

Nachdem im vorangegangenen Abschnitt der Einfluß einer Reihe von Stoffen auf die Vermehrung von *Haematococcus pluvialis* untersucht

und die vermehrungsfördernde Wirkung von Aneurin, Ascorbinsäure und von in Leberextrakt enthaltenen Wirkstoffen nachgewiesen worden war, sollte nun eine größere Anzahl weiterer geeigneter Algenstämme in bezug auf ihr Verhalten diesen Wuchsstoffen gegenüber untersucht werden. Es sollte sichergestellt werden, ob die gefundene Vitaminwirkung sich auf *Haematococcus* beschränkt, oder eine allgemeine Erscheinung bei mixotrophen Organismen ist.

Zuerst mußten geeignete Algenstämme ausgewählt werden. Verlangt wurde, daß sie in Mineralsalzlösung am Licht, in Nährsalzlösungen mit organischer Stickstoff- und Kohlenstoffquelle am Licht und im Dunkeln gedeihen können. Da von den meisten zur Verfügung stehenden Stämmen unbekannt war, wieweit sie dieser Anforderung entsprechen, mußten diese auf ihre Eignung hin untersucht werden. Aus der Kultursammlung unseres Instituts wurde eine ganze Reihe von Stämmen, insgesamt 50, überprüft, wobei sich 15 Stämme als geeignet erwiesen, deren Namen aus der Tabelle X zu ersehen sind. Die Züchtung erfolgte wieder in zwei Lösungen:

a) Grundlösung mit 0,1 % KNO_3 am Licht,

b) Grundlösung mit 0,1 % Pepton Vaillant und 0,2 % Na-Acetat am Licht und im Dunkeln.

Die Ergebnisse der Versuche sind in der Tabelle X zusammengefaßt, wobei nur die genannten 15 Stämme berücksichtigt wurden, die den obigen Anforderungen genügen. Bei einzelligen Arten erfolgt

Tabelle X. Eignung weiterer Algenstämme für die vorliegenden Untersuchungen.

	Erntcertrag (Anzahl der Zellen je cmm bzw. Schätzungswerte) nach 12 Tagen bei autotropher	mixotropher	heterotropher Ernährungsweise
Euglena gracilis	150	1200	800
„ *viridis*	80	1300	1000
Chlamydomonas agloeformis	100	2500	1500
„ *dorsoventralis*	180	1600	500
„ *humicola*	50	2000	2000
„ *orbicularis*	50	1000	400
„ *proteus*	50	2000	500
„ *pulvinata*	800	800	600
Chlorogonium tetragamum	180	2000	1600
Hormidium Barlowi	±	++	+
„ *spec.*	±	+	+
Pseudendoclonium basiliense	+	++	+
Uronema Barlowi	±	++	+
„ *confervicola*	+	++	+
„ *gigas*	±	++	+

— keine, ± schwache, + gute, ++ üppige Vermehrung.

die Angabe des Ernteertrages wiederum in der bisherigen Weise durch die Zellenzahl in cmm, bei fadenförmigen Stämmen in Schätzwerten.

Bevor an die Durchführung der im folgenden Abschnitt behandelten Versuche geschritten werden konnte, war eine Prüfung der für die betreffende Lösung am besten geeigneten Reaktionsbereiche notwendig. Diese Untersuchung mußte sich auf alle zur Verwendung gelangenden Lösungen erstrecken, da bekannt ist, daß für einen bestimmten Organismus der optimale p_H-Bereich wesentlich von der Zusammensetzung des Milieus bestimmt wird. Es kamen wieder die zwei bisherigen Nährlösungen zur Verwendung:

a) Grundlösung mit 0,1 % KNO_3, Züchtung am Licht (= autotrophe Ernährungsweise),

b) Grundlösung mit 0,1 % Pepton Vaillant und 0,2 % Natriumacetat am Licht (= mixotroph) und im Dunkeln (= heterotroph) gezüchtet.

Zur Erzielung der verschiedenen p_H-Abstufungen wurde zur Nährlösung ein jeweils verschiedenes Gemisch von Na_2HPO_4 und KH_2PO_4, zusammen stets m/300, gegeben, nachdem ein Vorversuch gezeigt hatte, daß diese Konzentration für keinen der verwendeten Organismen schädlich ist. Vollständig puffern diese Zusätze allerdings auch nicht, jedoch war es mit ihrer Hilfe möglich, wenigstens einigermaßen verschiedene Reaktionsbereiche zu erzielen.

Aus Gründen der Raumersparnis sollen die zahlreichen Einzelergebnisse dieser Versuchsreihe nicht in Tabellenform wiedergegeben werden. Im allgemeinen zeigte sich, daß für sämtliche untersuchten Organismen ein Reaktionsbereich angegeben werden kann, innerhalb dessen sie alle gut zu gedeihen vermögen. Im einzelnen zeigte sich bei autotropher Ernährungsweise ein Bereich von p_H 6,5 bis 7,0, bei mixotropher von p_H 6,5 bis 7,3 und bei heterotropher von p_H 6,7 bis 7,3 als geeignet. Die folgenden Versuche wurden daher sämtlich bei einer Reaktion von $p_H \pm 7{,}0$ angesetzt.

2. *Quantitative Bestimmung der Wuchsstoffwirkung.*

Zu den durch die im vorigen Abschnitt besprochenen Versuche ausfindig gemachten, für unsere Arbeit geeigneten Objekten kamen noch *Chlorogonium elongatum* und *Chl. euchlorum*, von denen die geforderten Eigenschaften bereits bekannt waren, und der vorher schon behandelte *Haematococcus pluvialis*. Mit diesen insgesamt 18 Stämmen wurde in einer Reihe von Versuchen in großem Maßstabe quantitativ die Vitaminwirkung bestimmt.

Die Versuche wurden in Halbliterkolben vorgenommen und nach 4 Wochen Versuchsdauer das Trockengewicht des Ernteertrages bestimmt. Folgende Nährlösungen kamen zur Verwendung:

a) Für die autotrophe Ernährung: Grundlösung mit 0,1 % KNO_3 im Licht;

b) für die mixotrophe Ernährung: Grundlösung mit 0,1 % Pepton Vaillant und 0,2 % Na-Acetat im Licht;

c) für heterotrophe Züchtung: die gleiche Lösung wie b), jedoch im Dunkeln.

Das Pepton Vaillant besitzt selbst Wuchsstoffe, durch Ausschütteln einer 10 %igen Lösung mit Carboraffin lassen sich indes die Wuchsstoffe nahezu quantitativ entfernen. Eine derart vorbehandelte Pepton-Vaillant-Lösung wurde für diese Versuche als Stammlösung verwendet, da Asparagin bzw. Glykokoll als organische Stickstoffquelle nicht für alle behandelten Organismen geeignet ist.

Der Vitaminzusatz erfolgte in den gleichen Konzentrationen wie vorher.

Im folgenden wird der Ernteertrag nur in der Menge der erzielten Trockensubstanz (*T*) in mg angegeben. Doch soll nicht dieser Wert unmittelbar zum Vergleich der Ernteerträge verwendet werden, sondern nach der bei *Nielsen* (1935, S. 153) üblichen Art der Faktor *f*, der das Verhältnis zwischen der mit Wuchsstoffbeigabe erzielten Ertragsmenge und der zusatzlosen Kontrolle kennzeichnet. Die Angabe bzw. die Ver-

Tabelle XI. Wuchsstoffwirkung auf verschiedene Algen bei autotropher Ernährung.

Organismus	Aneurin		Ascorbinsäure		Leberextrakt		Kontrolle
	T	*f*	*T*	*f*	*T*	*f*	*T*
Eugleninae:							
Euglena gracilis	16,7	2,0	28,4	3,5	26,6	3,2	8,2
„ *viridis*	18,0	2,9	48,1	7,9	28,8	4,7	6,1
Chlamydomonadae:							
Chlamydomonas agloeformis	86,1	6,0	264,5	18,6	215,4	15,2	14,2
„ *dorsoventralis*	104,0	6,4	321,6	19,9	284,4	17,6	16,2
„ *humicola*	16,8	1,7	268,3	27,4	198,9	20,3	9,8
„ *orbicularis*	125,3	10,8	365,5	31,5	284,1	24,5	11,6
„ *proteus*	108,6	4,5	388,6	16,2	292,4	12,2	24,0
„ *pulvinata*	89,4	4,6	265,1	13,7	240,0	12,4	19,4
Chlorogonium elongatum	12,4	1,5	84,6	10,3	61,9	7,5	8,2
„ *euchlorum*	20,6	1,9	76,3	7,2	60,9	5,7	10,6
„ *tetragamum*	16,6	1,9	168,0	19,5	24,2	2,8	8,6
Haematococcus pluvialis	61,6	2,2	95,0	3,5	80,5	2,9	27,5
Ulotrichales:							
Hormidium Barlowi	98,8	5,4	210,2	11,4	201,6	11,0	18,4
„ *spec.*	120,2	4,5	306,1	11,8	200,8	7,7	26,0
Pseudendoclonium basiliense	84,1	4,7	260,0	14,5	192,0	10,7	18,0
Uronema Barlowi	265,8	9,2	482,7	16,8	365,1	12,7	28,8
„ *confervicula*	199,6	9,6	477,2	22,9	410,6	19,7	20,8
„ *gigas*	209,6	7,9	537,4	20,4	480,0	18,2	26,4

T = mg Trockensubstanz je Kultur; *f* = Verhältnis *T*/zusatzloser Kontrolle.

wendung dieses Verhältnisfaktors hat den Vorteil, ein übersichtlicheres Bild zu geben, weil bei steigender Vitaminwirkung der Faktor *f* geradlinig wächst.

Die mikroskopische Kontrolle des Zellmaterials am Ende der Versuchsreihe hat ergeben, daß bei allen untersuchten Stämmen die Zellen reichlich Reservestoffe eingelagert hatten, so daß anfängliche Bedenken über die Brauchbarkeit der durch Trockengewichtsbestimmung erzielten Werte fallengelassen werden konnten. Hätten hingegen einige Versuche reservestoffreies Zellmaterial ergeben, dann wären die genannten Werte kaum vergleichbar gewesen.

Die vorliegenden Versuchsreihen hatten folgendes Ergebnis. (Tabelle XI bis XIII.) Bei autotropher Ernährung (Tabelle XI) sehen wir in allen Fällen eine mehr oder minder starke Wuchsstoffwirkung von Aneurin, Ascorbinsäure und Leberextrakt. Bei den *Eugleninae* ist der Unterschied in der Wirkung der drei Wuchsstoffquellen nicht bedeutend, bei den anderen beiden systematischen Gruppen — *Chlamydomonadae* und *Ulotrichales* — sehen wir jedoch eine bedeutend stärkere Ertragssteigerung durch Ascorbinsäure als durch Aneurin, was sich in einer

Tabelle XII. Wuchsstoffwirkung auf verschiedene Algen bei mixotropher Ernährung.

Organismen	Aneurin		Ascorbinsäure		Leberextrakt		Kontrolle
	T	*f*	*T*	*f*	*T*	*f*	*T*
Eugleninae:							
Euglena gracilis	36,5	3,6	42,8	4,2	38,1	3,7	10,2
„ *viridis*	66,2	6,5	65,8	6,5	59,2	5,8	10,2
Chlamydomonadae:							
Chlamydomonas agloeformis	315,4	11,3	298,8	10,7	269,5	9,6	28,0
„ *dorsoventralis*	487,3	23,4	468,8	22,5	365,1	17,5	20,8
„ *humicola*	366,2	29,1	384,1	30,5	300,8	23,9	12,6
„ *orbicularis*	500,6	26,9	472,0	25,4	361,0	19,4	18,6
„ *proteus*	487,1	13,2	477,5	13,0	387,3	10,5	36,8
„ *pulvinata*	293,1	14,2	304,0	14,8	263,0	12.8	20,6
Chlorogonium elongatum	89,7	8,5	79,3	7,5	64,0	6,0	10,6
„ *euchlorum*	95,4	5,2	90,3	5,0	60,8	3,3	18,2
„ *tetragamum*	95,8	12,1	81,0	10,3	72,1	9,1	7,9
Haematococcus pluvialis	173,0	5,8	221,5	7,4	132,5	4,4	29,8
Ulotrichales:							
Hormidium Barlowi	406,2	15,4	321,6	12,2	265,3	10,0	26,4
„ *spec.*	484,1	15,7	498,7	16,2	305,9	9,9	30,8
Pseudendoclonium basiliense	461,5	11,4	396,2	9,8	299,6	7,4	40,3
Uronema Barlowi	695,8	19,5	706,4	19,8	626,0	17,6	35,6
„ *confervicolum*	609,8	19,9	628,0	20,5	576,3	18,8	30,6
„ *gigas*	843.7	28.3	820,3	27,5	769,2	25,8	29,8

T = mg Trockensubstanz je Kultur; *f* = Verhältnis *T*/zusatzloser Kontrolle.

Tabelle XIII. Wuchsstoffwirkung auf verschiedene Algen bei heterotropher Ernährung.

Organismen	Aneurin		Ascorbinsäure		Leberextrakt		Kontrolle
	T	*f*	*T*	*f*	*T*	*f*	*T*
Eugleninae:							
Euglena gracilis	28,4	4,4	9,8	1,5	26,9	4,2	6,4
„ *viridis*	158,3	28,8	10,6	1,9	139,5	25,4	5,5
Chlamydomonadae:							
Chlamydomonas agloeformis	265,0	16,4	102,0	6,3	240,6	14,8	16,2
„ *dorsoventralis*	308,4	31,5	88,6	9,0	189,5	19,3	9,8
„ *humicola*	299,6	34,0	49,1	5,6	206,3	29,5	8,8
„ *orbicularis*	327,5	36,8	41,3	4,0	202,0	22,7	8,9
„ *proteus*	364,3	17,5	108,8	5,2	297,4	14,3	20,8
„ *pulvinata*	300,0	30,6	106,0	10,8	224,3	22,9	9,8
Chlorogonium elongatum	61,0	6,3	16,6	1,7	40,1	4,1	9,7
„ *euchlorum*	72,9	8,5	20,0	2,3	47,1	5,5	8,6
„ *tetragamum*	218,4	25,7	100,5	11,8	168,0	19,8	8,5
Haematococcus pluvialis	261,0	30,4	94,8	11,0	186,4	21,7	8,6
Ulotrichales:							
Hormidium Barlowi	268,3	13,7	162,4	8,3	220,0	11,2	19,6
„ *spec.*	302,6	14,7	88,6	4,3	241,0	11,7	20,6
Pseudendoclonium basiliense	364,1	16,3	98,9	4,4	273,8	12,2	22,4
Uronema Barlowi	654,6	39,9	182,1	11,1	495,8	30,2	16,4
„ *confervicolum*	586,1	29,9	184,6	9,4	524,0	26,7	19,6
„ *gigas*	698,7	33,7	204,3	9,9	579,8	28,0	20,7

T = mg Trockensubstanz je Kultur; *f* = *T*/zusatzloser Kontrolle.

auf das 10- bis 30fache gesteigerten Trockensubstanzproduktion bemerkbar macht. Der verwendete Leberextrakt steht, wie bisher immer festgestellt, in seiner Wirksamkeit zwischen den beiden Vitaminen, wobei er sich als näher bei dem wirksameren Vitamin stehend erweist.

Wenden wir uns nun der mixotrophen Ernährungsweise zu, so zeigt die obige tabellarische Aufstellung (Tabelle XII) in allen untersuchten Fällen eine ungefähr gleich starke, vermehrungsanregende Wirkung von Aneurin und Ascorbinsäure. Je nach dem geprüften Organismus nimmt das eine oder das andere Vitamin einen stärkeren Einfluß, ohne daß sich daraus eine Regel ableiten ließe. Der Leberextrakt steht in bezug auf seine Wirkungsintensität den beiden Vitaminen um ein Geringes nach.

Die letzte Tabelle XIII zeigt schließlich, welche Rolle unsere beiden Vitamine bei der rein heterotrophen Ernährungsweise spielen. Wir bemerken allgemein eine Veränderung in der Wirkung der beiden genannten Wuchsstoffe. Die Rolle des am stärksten vermehrungsanregenden Stoffes, die bei der autotrophen Ernährungsweise der Ascorbinsäure zukam, ist jetzt auf Aneurin übergegangen, nachdem sich, wie vorher aufgezeigt, bei der Züchtung unter mixotrophen Bedingungen beide Vitamine in bezug auf ihre Wirksamkeit das Gleich-

gewicht hielten. Der Leberextrakt nähert sich in seiner Wirkung dem B_1-Vitamin.

Vergleichen wir das Verhältnis des Ernteertrages der untersuchten Arten in den geschilderten Versuchen, so sehen wir die größten Erträge bei mixotropher Züchtung. Wir könnten daraus schließen, daß unsere Organismen bei Züchtung in einer Lösung mit organischer Kohlenstoff- und Stickstoffquelle am Licht sowohl Kohlensäure, als auch organischen Kohlenstoff assimilieren. Einige Stämme, wie *Euglena viridis* oder *Chlorogonium tetragamum*, neigen mehr zur heterotrophen Lebensweise, sie liefern die größten Erträge bei Züchtung im Dunkeln. Indes liegen die Beziehungen zwischen autotropher und heterotropher Ernährungsweise viel unklarer, als es diese aufgezeigten Tatsachen erscheinen lassen. Es sollen daher aus den angegebenen Versuchen keine weittragenden, allgemeinen Ableitungen gemacht werden, sondern es bleibt einer nachfolgenden, eingehenderen, bereits im Gange befindlichen Untersuchung überlassen, in diese Beziehungen Klarheit zu bringen.

Zusammenfassend kann gezeigt werden, daß sich auch hier die bei *Haematococcus pluvialis* festgestellten Zusammenhänge bestätigen lassen; nämlich, daß Ascorbinsäure eine starke Vermehrungssteigerung bei autotropher Ernährungsweise bedingt, Aneurin eine solche bei heterotropher. Bei mixotropher Lebensweise wirken beide Vitamine ungefähr in gleicher Stärke. Der Leberextrakt erweist auch hier wiederum seine vermehrungsfördernde Wirkung, steht jedoch in allen Fällen der Vitaminwirkung etwas nach. Ein gewisser fördernder Einfluß auf die Ernteertragsmenge ist aber auch bei Verwendung des für die betreffende Ernährungsweise nicht optimal wirksamsten Vitamins festzustellen. So erhalten wir bei Züchtung in reiner Mineralsalzlösung auch mit Aneurin, und bei Züchtung in einer Nährlösung mit organischen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen mit Ascorbinsäure eine gewisse Ertragssteigerung, die allerdings hinter der Wirkung des für den genannten Fall optimalen Wirkstoffes ziemlich zurückbleibt.

3. *Wuchsstoffgemische.*

Die Ergebnisse der im vorigen Abschnitt behandelten quantitativen Versuche ließen es wünschenswert erscheinen, Untersuchungen darüber anzustellen, welchen Einfluß ein Gemisch von Ascorbinsäure und Aneurin auf die Vermehrung unserer Stämme ausübt. Die Wirkung wurde durch Vergleich des Ernteertrages von Parallelkulturen mit nur einem Vitamin als Zusatz bzw. solche ohne Wuchsstoffbeigabe vorgenommen.

In Halbliterkolben wurden ähnlich wie in der vorherigen Versuchsreihe die einzelnen Versuche angesetzt und diesmal schon nach 14 Tagen die Ertragsmenge durch Trockengewichtsbestimmung festgehalten. Auf Grund der Ergebnisse der im vorigen Abschnitt behandelten Versuche ist diese

Kürzung der Versuchsdauer möglich. Da die durchschnittlichen Ertragsmengen von 200 bis 300 mg mehr als genug Material für eine exakte Wägung gaben, war anzunehmen, daß eine Herabsetzung der Versuchsdauer auf die Hälfte der Zeit immer noch genügend wägbare Mengen zeitigen würde. Diese Hoffnung wurde im Laufe der Versuchsdauer erfüllt.

Die Versuche lieferten das folgende Ergebnis (Tabelle XIV bis XVI).

Tabelle XIV. Wirkung eines Vitamingemisches auf verschiedene Algen bei autotropher Ernährungsweise.

Organismen	Aneurin		Aneurin + Ascorbinsäure		Ascorbinsäure		Kontrolle
	T	*f*	*T*	*f*	*T*	*f*	*T*
Eugleninae:							
Euglena gracilis	4,6	2,0	10,0	4,4	9,2	4,0	2,3
„ *viridis*	6,2	2,2	24,1	8,6	23,8	8,5	2,8
Chlamydomonadae:							
Chlamydomonas dorsoventralis	33,1	6,5	120,4	23,6	104,5	20,5	5,1
„ *humicola*	4,9	1,9	101,2	39,1	72,8	28,0	2,6
„ *orbicularis*	38,9	9,5	133,3	32,5	123,8	30,2	4,1
Chlorogonium euchlorum	5,2	1,8	27,5	9,5	23,2	8,0	2,9
Haematococcus pluvialis	18,2	2,0	43,7	4,8	38,2	4,2	9,1
Ulotrichales:							
Hormidium Barlowi	28,0	5,5	58,6	11,5	56,1	11,0	5,1
Uronema Barlowi	65,6	10,1	163,8	25,2	111,8	17,2	6,5
„ *gigas*	71,4	8,5	260,4	31,0	184,8	22,0	8,4

T = mg Trockensubstanz je Kultur; *f* = *T*/zusatzlose Kontrolle.

Tabelle XV. Wirkung eines Vitamingemisches auf verschiedene Algen bei mixotropher Ernährungsweise.

Organismen	Aneurin		Aneurin + Ascorbinsäure		Ascorbinsäure		Kontrolle
	T	*f*	*T*	*f*	*T*	*f*	*T*
Eugleninae:							
Euglena gracilis	14,0	4,0	36,4	10,4	15,7	4,5	3,5
„ *viridis*	25,4	6,2	55,4	13,5	24,6	6,0	4,1
Chlamydomonadae:							
Chlamydomonas dorsoventralis	152,8	24,0	238,7	38,5	125,2	20,2	6,2
„ *humicola*	112,0	32,0	175,4	50,1	122,8	35,1	3,5
„ *orbicularis*	142,8	28,0	203,5	39,9	134,1	26,3	5,1
Chlorogonium euchlorum	17,0	5,0	42,8	12,6	17,0	5,0	3.4
Haematococcus pluvialis	69,4	6,2	122,1	10,9	90,7	8,1	11,2
Ulotrichales:							
Hormidium Barlowi	106,9	15,5	173,2	25,1	82,8	12,0	6,9
Uronema Barlowi	157,6	20,2	253,5	32,5	168,5	21,6	7,8
„ *gigas*	238,1	25,6	407,3	43,8	225,8	24,5	9,3

T = mg Trockensubstanz je Kultur; *f* = *T*/zusatzlose Kontrolle.

Tabelle XVI. Wirkung eines Vitamingemisches auf verschiedene Algen bei heterotropher Ernährungsweise.

Organismen	Aneurin		Aneurin + Ascorbinsäure		Ascorbinsäure		Kontrolle
	T	*f*	*T*	*f*	*T*	*f*	*T*
Eugleninae:							
Euglena gracilis	14,3	6,5	14,0	6,4	2,6	1,2	2,2
„ *viridis*	63,6	26,5	64,3	26,8	4,3	1,8	2,4
Chlamydomonadae:							
Chlamydomonas dorsoventralis	192,2	31,0	199,0	32,1	50,2	8,1	6,2
„ *humicola*	153,0	34,0	158,4	35,2	18,0	4,0	4,5
„ *orbicularis* ..	228,1	37,4	234,8	38,5	17,7	2,9	6,1
Chlorogonium euchlorum	35,9	9,2	39,4	10,1	4,7	1,2	3,9
Haematococcus pluvialis	256,2	30,5	278,0	33,1	70,6	8,4	8,4
Ulotrichales:							
Hormidium Barlowi	39,7	12,8	41,8	13,5	13,0	4,2	3,1
Uronema Barlowi	180,9	40,2	184,5	41,0	40,9	9,1	4,5
„ *gigas*	125,1	36,8	126,1	37,1	27,2	8,0	3,4

T = mg Trockensubstanz je Kultur; f = T/zusatzlose Kontrolle.

Die untersuchten Organismen liefern, in einer reinen Mineralsalzlösung gezüchtet, bei Zusatz von Ascorbinsäure und Aneurin kein wesentlich anderes Ergebnis als bei Kultur in der gleichen, jedoch nur Ascorbinsäure enthaltenden Nährlösung. Während Aneurin für sich allein eine gewisse, wenn auch geringe Ertragssteigerung zu veranlassen vermag — siehe die vorangegangenen Versuchsreihen —, so erzeugt ein Aneurinzusatz zu einer bereits ascorbinsäurehaltigen Nährlösung keinen höheren Ernteertrag als das C-Vitamin allein. Der Ernteertrag hängt also nur von dem Vorhandensein der Ascorbinsäure ab. Wieder sehen wir hierin einen Beweis für die Bedeutung der Ascorbinsäure allein für die autotrophe Ernährungsweise.

Ein etwas abweichendes Verhalten zeigen die beiden *Uronema*-Arten, bei diesen bewirkt eine gleichzeitige Zugabe von Vitamin B_1 und C zur Nährlösung einen größeren Ernteertrag, als er durch Ascorbinsäure allein verursacht wird.

Betrachten wir die Ergebnisse bei Züchtung unter mixotrophen Bedingungen, so sehen wir eine Addition der Wirkung bei Anwesenheit beider Vitamine im Vergleich zu den Versuchen mit nur einem der beiden Vitamine. Der Grad der Vermehrungssteigerung durch das Wuchsstoffgemisch ist bei den einzelnen Organismen verschieden. Die *Euglena*-Arten zeigen eine vollständige Addition der Wirkung, bei den *Chlamydomonadae* und *Uronema*-Arten stiegen die Ernteerträge jedoch nicht bis zur Summe der Erträge mit den beiden Vitaminen allein.

Bei der heterotrophen Ernährungsweise lieferten die Trockengewichtsbestimmungen ein den Befunden bei autotropher Züchtung

ähnliches Ergebnis, mit dem grundsätzlichen Unterschied, daß hier das Aneurin der ausschlaggebende Faktor ist, welcher die Trockensubstanzproduktion beeinflußt. Ascorbinsäurezugabe zu einer aneurinhaltigen Nährlösung bleibt ohne Erfolg.

Überblicken wir diese ganze Versuchsreihe über den Einfluß von Vitamingemischen auf die Vermehrung, so ergibt sich neuerdings mit voller Klarheit, daß die autotrophe Ernährung im wesentlichen von der Ascorbinsäure, die heterotrophe von Aneurin allein beeinflußt wird. Unter mixotrophen Bedingungen sind, wie aus dem Vorausgegangenen bekannt ist, beide Vitamine wirksam, die Zugabe beider gleichzeitig läßt die Ernteerträge ansteigen, doch zeigen sich individuelle Verschiedenheiten. Bei rein mixotrophen Organismen findet eine nahezu 100 %ige Addition der Wirksamkeit statt, bei solchen, die mehr nach der heterotrophen Seite neigen, ist die Ertragssteigerung geringer.

Bei der vorliegenden Versuchsreihe ergab sich besonders augenfällig die unbedingte Notwendigkeit, für diese Versuche nur Organismen zu verwenden, die unter allen drei Lebensbedingungen, nämlich auto-, mixo- und heterotroph, zu gedeihen vermögen. Hätte man die für autotrophe und heterotrophe Ernährung bedeutungsvollen Wuchsstoffe an rein auto- bzw. heterotrophen Formen untersucht, so wäre verborgen geblieben, inwieweit die nachgewiesenen Wirkungen durch das Versuchsobjekt bestimmt sind. Hier aber haben wir die Gewißheit, die unter den verschiedenen Lebensbedingungen aufgezeigten Erscheinungen mit Recht verglichen zu haben.

4. Wuchsstoffzusätze während der Versuchsdauer.

Anschließend an die im Abschnitt A 7 (S. 102) geschilderten Versuche und auf Grund der Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen der Ernteertragssteigerung durch Vitaminzugaben erschien es aufschlußreich zu werden, an Hand des Vermehrungsverlaufes zu untersuchen, welchen Einfluß ein neuerlicher Wuchsstoffzusatz bei Erreichen des maximalen Ertrages, also ungefähr am zehnten Tage der Versuchsdauer, auf diesen ausüben würde.

In der schon früher geschilderten Weise wurden Versuche in größeren Kolben angesetzt, alle 2 Tage etwas Zellmaterial unter aseptischen Bedingungen entnommen und die Zellenzahl in cmm bestimmt. Wenn nach den früheren Ergebnissen die größte Zellzahl erreicht schien, wurde neuerdings Vitamin zugesetzt. Um die allfälligen Erscheinungen deutlicher hervortreten zu lassen, wurde bei diesen Versuchen nicht die übliche optimale Vitaminkonzentration von 0,001 % angewendet, sondern zu 100 ccm der Versuchslösung nur 10 γ Vitamin zugesetzt.

Als Versuchsobjekte wurden nur einige Vertreter der im vorigen Abschnitt behandelten Stämme genommen; denn in den vorhergehenden Versuchsreihen zeigte sich immer wieder ein gleichartiges Verhalten

systematisch nahestehender Arten. Es wurde daher eine Beschränkung der Zahl der Versuchsobjekte durchgeführt, und zwar derart, daß je zwei Vertreter der im vorhergehenden untersuchten systematischen Gruppen zu der neuen Versuchsreihe herangezogen wurden.

Im folgenden sollen die Ergebnisse der einzelnen Versuche besprochen und — soweit dies nötig ist — graphisch dargestellt werden.

Autotrophe Ernährungsweise.

Ein Zusatz von Ascorbinsäure zu einer reinen Mineralsalzlösung bewirkte im Vergleich mit der Kontrolle ohne Vitaminzusatz die übliche Steigerung der Zellzahl, am zehnten Tage war das Maximum erreicht; nun wurde zu einem Teil der Versuche Aneurin, zu einem anderen Teil Ascorbinsäure zugesetzt, ein dritter Teil blieb ohne Zusatz zur Kontrolle. Der Aneurinzusatz hatte in allen Fällen kein weiteres Ansteigen der Vermehrung zur Folge, der neuerliche Ascorbinsäurezusatz dagegen bewirkte bei allen untersuchten Organismen ein Emporschnellen der Vermehrungskurve. Da sich, wie oben festgestellt, alle geprüften Organismen gleich verhielten, sollen im weiteren die Verhältnisse nur an Hand eines Organismus — *Euglena gracilis* — aufgezeigt werden. Dieses Versuchsobjekt lieferte die anschaulichsten Ergebnisse (Abb. 4).

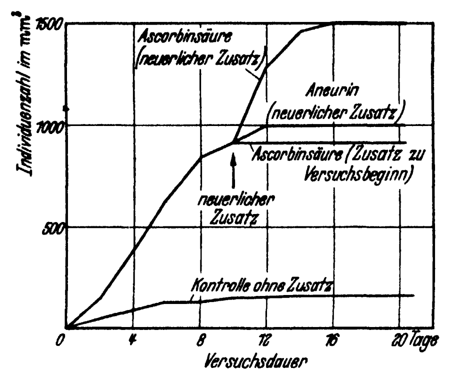


Abb. 4. *Euglena gracilis*, autotroph gezüchtet. Wirkung eines wiederholten Zusatzes von Ascorbinsäure und Aneurin.

Die Deutung dieser Ergebnisse kann wohl nur so sein, daß das ursprünglich zugesetzte C-Vitamin nach 10 Tagen nahezu verbraucht ist, daher eine weitere Vermehrung nicht mehr stattfindet, ein neuerlicher Zusatz davon aber wieder die anfängliche Wirkung zeigt. Daß Aneurin bei der autotrophen Ernährung keine wesentliche Rolle spielt, ergibt sich auch hier wiederum eindeutig daraus, daß eine Beigabe davon zu einem Zeitpunkt, wo die anfänglich zugesetzte Ascorbinsäure bereits verbraucht ist, keine weitere Ertragssteigerung mit sich bringt.

Mixotrophe Ernährungsweise.

Der üblichen Nährlösung mit organischer Kohlenstoff- und Stickstoffquelle wurde Aneurin vom Anfang an zugesetzt. Es erfolgte Vermehrung in der für Aneurin charakteristischen Weise. Sobald die

Vitaminwirkung aufzuhören begann, wurde wieder zu einem Teil der Versuche Aneurin, zu einem anderen Teil Ascorbinsäure zugesetzt; ein dritter Teil blieb zur Kontrolle ohne Zusatz.

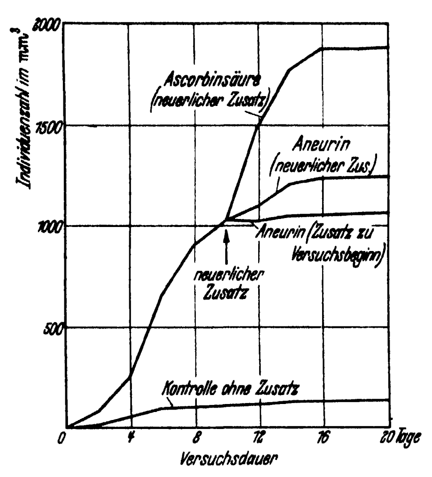


Abb. 5. *Euglena gracilis*, mixotroph gezüchtet. Wirkung eines wiederholten Zusatzes von Ascorbinsäure und Aneurin.

Der neuerliche Aneurinzusatz bewirkte abermals eine, allerdings geringe Steigerung der Vermehrung, während ein Zusatz von Ascorbinsäure die Vermehrungskurve stark ansteigen ließ, ein Zeichen dafür, daß beide Vitamine auf verschiedene Weise die Vermehrung beeinflussen. Im nachstehenden wird darauf noch zurückzukommen sein (Abb. 5).

Heterotrophe Ernährungsweise.

Der Kurvenverlauf der Ernteerträge gleicht dem bei autotropher Ernährung bei Ascorbinsäurezusatz, jedoch mit dem grundsätzlichen Unterschied, daß die beiden Vitamine ihre Rolle als ausschlaggebende Faktoren gewechselt haben.

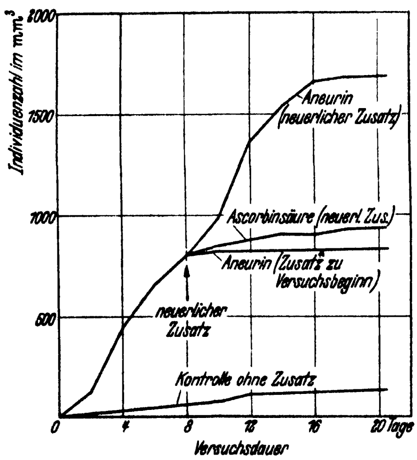


Abb. 6. *Euglena gracilis*, heterotroph gezüchtet. Wirkung eines wiederholten Zusatzes von Ascorbinsäure und Aneurin.

Das anfänglich zugesetzte Aneurin ist in allen Versuchen nach 10 Tagen nahezu verbraucht, ein weiterer Zusatz davon brachte bei allen untersuchten Arten ein neuerliches, starkes Ansteigen der Vermehrung mit sich, die Ernteerträge sind durchwegs bedeutend höher im Vergleich zu der ohne neuerlichen Aneurinzusatz gebliebenen, oder mit Ascorbinsäure versetzten Probe. Auch hier sollen die Ergebnisse an Hand von Vermehrungskurven bei *Euglena gracilis* dargestellt werden (Abb. 6).

Der Vergleich der Ergebnisse der drei Versuchsreihen ergibt wiederum den Beweis für die in allen früheren Versuchen gefundene Tatsache: Ascorbinsäure stellt einen Wirkstoff bei ausschließlicher Ernährung mit anorganischen Nährsalzen, Aneurin einen solchen bei

Ernährung mit organischen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen im Dunkeln dar. Unter Bedingungen, die sowohl die Assimilation der Kohlensäure, als auch organischer Nährstoffe ermöglichen, sind Aneurin und Ascorbinsäure in gleichem Maße wirksam.

Besprechung der Versuchsergebnisse.

Die vorliegenden Untersuchungen erbringen den Beweis, daß ebenso wie die Vermehrung heterotropher, auch die Vermehrung mixotropher Organismen in starkem Maße vom Vorhandensein gewisser Wirkstoffe abhängig ist.

Es hat sich gezeigt, daß dort, wo ein Organismus auf Substanzgewinn aus dem Kohlensäureassimilationsprozeß angewiesen ist, die Ascorbinsäure, wo er auf die Aufnahme organischer Kohlenstoff- (und vielleicht auch Stickstoff-) Quellen angewiesen ist, das Aneurin wirksam ist.

Darüber hinaus müssen zwei Punkte einer näheren Betrachtung unterworfen werden, da sie eine gewisse Abweichung zwischen den vorliegenden und den Ergebnissen anderer Autoren darzustellen scheinen: Das Vermögen der untersuchten, mixotrophen Algen auch ohne Wirkstoffbeigabe einen gewissen, wenn auch geringen Ernteertrag liefern zu können und ferner die bei den untersuchten Organismen stets höherliegende optimale Dosis der Wirkstoffe, als dies bei heterotrophen Mikroorganismen gefunden wurde.

Das Wirkstoffbedürfnis eines Organismus wird heute allgemein als Verlust der Fähigkeit, diesen Stoff selbst synthetisieren zu können, gedeutet. Nach *Schopfer* (1939) könnte dieses Synthesevermögen in verschieden starkem Maße verlorengegangen sein; demnach wären unsere Fälle so zu deuten, daß die hier untersuchten Organismen imstande sind, Ascorbinsäure und Aneurin, oder zumindest dessen Vorstufen selbst herstellen zu können, wenn vielleicht auch in geringerem Maße als andere, verwandte Arten der gleichen Gattung. Wie *Schopfer* (1939) mit Recht verlangt, muß jeder Fall besonders geprüft werden, wenn nachgewiesen sein soll, daß das Wirkstoffbedürfnis durch Verlust der Synthesefähigkeit entstanden ist. Im Rahmen einer der nächsten Mitteilungen soll dies auch durch experimentelle Untersuchungen nachgeholt werden. Auf Grund der Befunde von *Simeon, Norris* und *Williams*, welche 1937 Ascorbinsäure und Aneurin im Zellsaft verschiedener Algen nachgewiesen haben, scheint es naheliegend, daß auch die hier untersuchten Stämme mehr oder minder zur Synthese befähigt sind.

Kurz zusammengefaßt kann also gesagt werden: Wohl durch das Vermögen, Ascorbinsäure und Aneurin in beschränktem Maße bilden zu können, sind die hier untersuchten Arten imstande, sich in einer

vitaminfreien Nährlösung einigermaßen vermehren zu können. Ein Vitaminzusatz steigert den Ernteertrag dann noch um ein Vielfaches.

Wie aufgezeigt, verlangen unsere Organismen eine höhere optimale Dosis des Wirkstoffes, als dies bei heterotrophen Mikroorganismen der Fall ist. Nun sind aber bei heterotrophen Organismen nicht etwa immer die gleichen optimalen Dosen gefunden worden, sondern auch hier zeigten sich oft beträchtliche Unterschiede, wie aus der folgenden Zusammenstellung (Tabelle XVII) zu entnehmen ist.

Tabelle XVII. Optimale Aneurinkonzentrationen bei verschiedenen Organismen.

Name	Optimale Dosis, bezogen auf 100 ccm Nährlösung	Autor
Ustilago violacea	0,015 γ	*Schopfer* 1938
Polyporus adustus	0,150 γ *	*Kögl* und *Fries* 1937
Rhodotorula rubra	0,800 γ	*Schopfer* 1938
Phycomyces blakesleeanus	2,000 γ	*Schopfer* 1935
Chilomonas und andere farblose *Flagellaten*	1,000 γ	*Ondratschek* (bisher nicht veröffentlicht)
Haematococcus pluvialis	100,000 γ	*Ondratschek* 1940

* Nach einer Kurve berechnet.

Neben den zwei eben besprochenen Ergebnissen hat die vorliegende Arbeit jedoch gezeigt, daß Aneurin auch für grüne, mixotrophe Organismen einen Wirkstoff darstellt, welcher namentlich bei Züchtung unter heterotrophen Bedingungen, also in einer Nährlösung mit organischer C- bzw. N-Quelle im Dunkeln, nahezu unentbehrlich ist. Neu ist die Feststellung, daß bei Kultivierung in einer rein anorganischen Nährlösung Ascorbinsäure den Ernteertrag wesentlich steigert. Ascorbinsäure ist nach unseren Erfahrungen für die autotrophe Ernährungsweise ebenso wichtig wie Aneurin für die heterotrophe. Bei Züchtung in einer organischen Nährlösung am Licht, also unter „mixotrophen“ Bedingungen, ist jedes der beiden Vitamine einmal für sich allein wirksam — ungefähr in gleich starkem Maße —, es konnte aber auch bei gleichzeitiger Beigabe beider Vitamine eine Addition der Teilwirkungen festgestellt werden.

Zusammenfassung.

Es wurde der Einfluß von Aneurin, Ascorbinsäure und eines Leberextrakts (Pernemon) auf die Vermehrung einiger mixotropher Grünalgen untersucht.

Ascorbinsäure stellt eine vermehrungsfördernde Substanz namentlich bei Ernährung mit Kohlensäure und anorganischen Salzen dar,

Aneurin hingegen bei Ernährung mit organischen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen. Die optimale Konzentration beider Vitamine liegt hier höher als z. B. bei Pilzen, nämlich bei 100 γ/100 ccm Nährlösung. Der Leberextrakt wirkt in beiden Fällen vermehrungsanregend, ist jedoch in seiner Wirkung schwächer als die beiden Vitamine.

Literatur.

Czurda, V., Beih. z. Bot. Centralbl. Abt. A, **53**, 158, 1935.

Grab, W., Vitamine und Hormone. München, Lehmann, 1937.

Hartelius, V., C. r. Lab. Carlsberg **22**, 211, 1938. — *Hartelius, V.* u. *Hjorth-Hansen*, ebenda **21**, 221, 1936.

Janke, A., Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **100**, 409, 1939.

Kögl, F., Angew. Chem. **46**, 469, 1933; Naturwiss. **21**, 27, 1933; Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **68**, 16, 1935; Naturwiss. **23**, 839, 1935; Svensk Kemisk Tidskrift **48**, 145, 1936; Naturwiss. **25**, 465, 1937. — *Kögl, F.* u. *Fries, N.*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **249**, 93, 1937. — *Kögl, F.* u. *Haagen-Smith, A. J.*, Proc. Kon. Acad. Wetensch. Amsterdam **34**, 144, 1931.

Lund, A., C. r. Lab. Carlsberg **21**, 231, 1936. — *Lwoff, A.*, Recherches biochemiques sur la nutrition des Protozoaires. Paris, Masson, 1932; Arch. Protistenk. **90**, 194, 1938. — *Lwoff, A.* u. *Dusi, H.*, C. r. Acad. Sc. **205**, 756, 1937; **205**, 630, 1937; **205**, 882, 1937; C. r. Soc. Biol. **127**, 53, 1938. — *Lwoff, A.* u. *M.*, C. r. Soc. Biol. **126**, 644, 1937. — *Lwoff, A.* u. *Pirovsky, I.*, ebenda **124**, 1169, 1937. — *Lwoff, M.*, C. r. Soc. Biol. **126**, 771, 1937; C. r. Acad. Sc. **206**, 540, 1938.

Nielsen, N., C. r. Lab. Carlsberg **21**, 151, 1935. — *Nielsen, N.* u. *Fang Sing-Fang*, ebenda **22**, 141, 1937. — *Nielsen, N.* u. *Hartelius, V.* C. R. Lab. Carlsberg **22**, 249, 1938; Biochem. Zeitschr. **296**, 171, 1938; **296**, 359, 1938. — *Norris, E. R.*, *Simeon, M. K.* u. *Williams, H. B.*, J. Nutrition **13**, 425, 1937.

Pringsheim, E. G., Beitr. Biol. Pfl. **12**, 413, 1914; Beih. Bot. Centralbl., Abt. A, **55**, 100, 1936. — *Provasoli, L.*, C. r. Soc. Biol. **127**, 190, 1938; Boll. Zool. Agr. Milano **9**, 3, 1938.

Schopfer, W. H., Zeitschr. f. Vitaminforsch. **4**, 187, 1935; diese Zeitschr. **6**, 510, 1935; Protoplasma **28**, 381, 1937; Bull. Soc. Bot. Suisse **47**, 460, 1937; Act. Soc. Helv. Sc. Nat. **118**, 62, 1937; diese Zeitschr. **9**, 116, 1938; Protoplasma **31**, 105, 1938; Vitamine und Wachstumsfaktoren bei den Mikroorganismen, mit besonderer Berücksichtigung des Vitamins B_1. In „Ergebnisse der Biologie“ **16**. Berlin, Jul. Springer, 1939. — *Schopfer, W. H.* u. *Blumer, S.*, diese Zeitschr. **9**, 305, 1938; *Schopfer, W. H.* u. *Jung, A.*, Zeitschr. f. Vitaminforsch. **7**, 143, 1938; *Schopfer, W. H.* u. *Moser, W.*, Protoplasma **26**, 538, 1936; *Schopfer, W. H.* u. *Müller, V.*, C. r. Soc. Biol. **128**, 372, 1938; *Schopfer, W. H.* u. *Rytz, W.*, diese Zeitschr. **8**, 244, 1937.

Berichtigung.

In der Arbeit *R. Schaede* „Zum Problem des Vorkommens von chromatischer Substanz bei Bakterien und Actinomyceten“ in Bd. 10, Heft 4, dieses Archivs sind die Ätzungen der Abb. 12 und 13 (S. 490 und 491) nicht klar wiedergegeben worden und könnten Anlaß zu falschen Schlüssen geben. Sie werden nochmals abgedruckt.

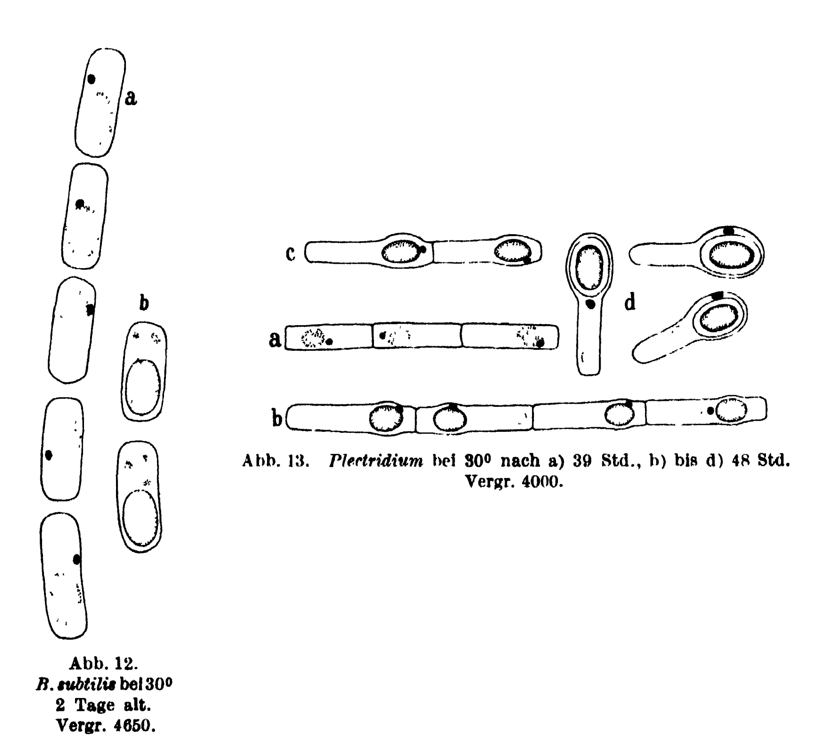


Abb. 12. *B. subtilis* bei 30° 2 Tage alt. Vergr. 4650.

Abb. 13. *Plectridium* bei 30° nach a) 39 Std., b) bis d) 48 Std. Vergr. 4000.

(Dal Laboratorio di Microbiologia Agraria e Tecnica della Facoltà Agraria della Regia Università di Perugia.)

Sulla validità del genere Torulaspora.

Per

Tommaso Castelli.

Con 3 figure nel testo.

(Eingegangen am 20. Februar 1940.)

In ricerche eseguite presso questo laboratorio sugli agenti della fermentazione vinaria nella regione umbra (1, 2) fu segnalato l'attivo intervento della *Torulaspora Rosei*. Su 379 culture ottenute nell'indagine di 87 mosti provenienti dalle diverse località umbre vennero isolati 21 stipiti di *Torulaspora Rosei* riscontrati in 11 mosti. I risultati ottenuti nelle ricerche eseguite nella regione umbra nel 1933, trovarono una valida conferma nelle indagini svolte nel 1936 nella regione del Chianti classico e zone limitrofe (3) e in quelle del 1937 sempre nella zona del Chianti classico (4). Nel 1936, su 93 mosti esaminati, la *Torulaspora Rosei* venne riscontrata presente in 18 mosti, mentre nelle indagini del 1937 detto blastomicete venne riscontrato in quattro, su 10 mosti presi in considerazione.

Sia per l'elevata percentuale di frequenza con la quale la *Torulaspora Rosei* si riscontra nei mosti naturalmente fermentanti, come per la non indifferente quantità di alcool che detta specie è capace di produrre si può ritenere che la presenza, nel processo fermentativo, della *Torulaspora Rosei*, non pregiudichi minimamente l'ottenimento di un vino coi normali caratteri organolettici (5). A questo riguardo credo necessario esporre le quantità di alcool che gli stipiti di minima e massima attività, isolati dalle varie località si sono dimostrati capaci di produrre.

Culture isolate nella regione umbra nel **1933**; stipite di minima **7,34** % in peso (**9,24** % in volume), stipite di massima **9,98** % in peso (**12,58** % in volume). Culture isolate nel Chianti classico e zone limitrofe nel **1936**; stipite di minima **7,86** % in peso (**9,90** % in volume) stipite di massima **10,60** % in peso (**13,35** % in volume).

Culture isolate nel Chianti classico nel **1937**; stipite di minima **7** % in peso (**8,82** % in volume), stipite di massima **10** % in peso (**12,60** % in volume).

E senza dubbio particolarmente interessante, anche ai fini pratici, si presenta, l'indagine rivolta a stabilire quali sono, sia qualitativamente che quantitativamente, i prodotti, sia principali come secondari, della fermentazione operata nel mosto d'uva dalla *Torulaspora Rosei* e da altri blastomiceti che si rinvengono frequentemente nella microflora dei

mosti italiani. Alcune di queste indagini sono pertanto in corso di esecuzione in questo laboratorio.

La *Torulaspora Rosei Guilliermond* venne isolate da *Rose* da secrezioni mucose di alcune quercie e successivamente è stata riscontrata da altri ricercatori. In Italia ricordo una segnalazione di *Verona* e *Luchetti* (6) che hanno isolato la *Torulaspora Rosei* da un vino cotto della regione marchigiana ed una di *Sacchetti* (7) che ha trovato detto blastomicete su bacche di vischio. Il genere *Torulaspora Lindner* è attualmente riconosciuto, per quanto mi consta, dalla grande maggioranza dei ricercatori, esso è pertanto riferito nel sistema elaborato dalla *Stelling-Dekker* (8) ed è riportato anche in una abbastanza recente rassegna di *Guilliermond* (9). Il genere *Torulaspora Lindner*, che è molto prossimo e si può considerare intermedio tra il genere *Saccharomyces Meyen* e *Zygosaccharomyces Barker*, presenta cellule rotonde riunite anche a gruppi. Aschi formantisi per partenogenesi spesso in seguito a fatti pseudocopulativi. Ascospore rotonde a parete liscia generalmente in numero di 1—2 per asco e contenenti un globulo di grasso. Forme che vegetano sottoforma di deposito e che non danno velo o anello o li producono soltanto nelle vecchie culture. I blastomiceti che secondo la *Stelling-Dekker* si debbono riportare attualmente al genere *Torulaspora* sono i seguenti: *Torulaspora Delbrücki Lindner* (isolata da una birra inglese), *Torulaspora Rosei Guilliermond* (isolata da secrezioni mucose di quercie) e *Torulaspora fermentati Saito* (isolata da un mosto in fermentazione derivante dalla saccarificazione del sorgo).

Nel 1932 il *Krumbholz* (10) si è domandato se fosse legittimo conservare il genere *Torulaspora*. In base a confronti stabiliti tra la *Torulaspora Rosei* e lo *Zygosaccharomyces globiformis* (11) e avendo osservato che in ambedue le forme la produzione degli aschi derivava anche da fatti di copulazione, il *Krumbholz* ha stabilito l'identità delle due forme e ritiene non doversi più considerare valido il genere *Torulaspora*. In tal maniera *Torulaspora Rosei* cade in sinonimia con *Zygosaccharomyces globiformis* mentre per le altre due specie del genere *Torulaspora* vengono proposte le nuove combinazioni: *Zygosaccharomyces Delbrücki (Lindner) Kr.* e *Zygosaccharomyces fermentati (Saito) Kr.*

Sacchetti in base a prove di fermentazione su l'inulina e la destrina, eseguite parallelamente su *Torulaspora Rosei-Zygosaccharomyces globiformis* e su di una forma isolata da bacche di vischio, molto prossima a *Torulaspora Rosei*, pur riservandosi di trattare in altro luogo i risultati delle indagini citologiche sulle cellule vegetative e sugli aschi, è portato a ritenere perfettamente giustificata l'affermazione di *Krumbholz*.

Come è stato precedentemente accennato, in questo laboratorio sono state ottenute numerose culture di blastomiceti, isolate da mosti in fermentazione delle regioni Umbra e Toscana, da riportare a *Torulaspora Rosei*. Nei numerosissimi saggi di sporificazione di volta in volta eseguiti e nelle molteplici osservazioni fatte sulle cellule, sui prolungamenti che si producono precedentemente alla formazione degli aschi e sugli aschi medesimi, non ho potuto mai osservare che tra le cellule o i prolungamenti da esse emessi, vi fossero dei fatti di fusione onde l'asco formatosi fosse il risultato di una vera coniugazione e quindi detti blastomiceti fossero da riportare al genere *Zygosaccharomyces*.

È pur vero che, se in alcune specie del genere *Zygosaccharomyces* i fatti di coniugazione sono molto evidenti e gli aschi che derivano per partenogenesi sono scarsissimi, ne esistono altre nelle quali il numero delle cellule che si trasforma in asco è molto esiguo e di questo numero soltanto una minima parte è il derivato di una tipica coniugazione. Un caratteristico esempio di quanto ho accennato si osserva nello *Zygosaccharomyces florentinus* da me riscontrato in un mosto dei colli fiorentini nelle indagini del 1936 (12), e che si può pertanto considerare una tipica forma di transizione tra i generi *Torulaspora* e *Zygosaccharomyces*. Trovandomi in possesso di un certo numero di stipiti di *Torulaspora Rosei* ho creduto opportuno eseguirne uno studio molto diligente ed accurato, e nello stesso tempo parallelamente alle mie culture e con le medesime modalità, ho sottoposto all'indagine anche una cultura di *Zygosaccharomyces globiformis* forma tipica, avuta dal Centraalbureau voor Schimmelcultures di Baarn.

Non credo necessario riportare la tecnica seguita nell'indagine, perchè essa si trova ampiamente descritta nelle mie note già citate e perchè corrisponde, sia pure con lievissime modificazioni, a quella adottata dalla *Stelling-Dekker*. Gli stipiti presi in considerazione, riportati con i loro numeri della collezione o del protocollo di esperienze, sono stati i seguenti *63, 64, 65, 66* isolati da vari mosti dell'Umbria nella vendemmia del 1933; *50, 75, 77, 175, 202, 223, 248, 250, 390, 426, 443, 463, 495, 499, 501, 509* isolati dai mosti del Chianti classico, colli senesi e colli fiorentini durante le vendemmie del 1936 e 1937, e lo *Zygosaccharomyces globiformis*. Tutte queste culture sono state mantenute in vita eseguendone circa ogni mese un passaggio, alternativamente su mosto d'uva e su agar di malto. Preferisco subito accennare che tutti gli stipiti sottoposti allo studio si sono dimostrati identici e le lievi diversità riscontrate non erano tali da permetterne una sufficiente differenziazione sia pure nell'ambito della varietà. I caratteri pertanto ottenuti per tutti gli stipiti si possono così riassumere.

La colonia su gelatina di mosto o su gelatina di malto dopo 5—6 giorni a 18° si presenta rotonda, gibbosa, liscia e a margini uniti, di colore bianco e di aspetto ceroso, non liquefacente.

Nelle giovani culture su mosto d'uva o su infuso di malto sviluppate a 25°, le cellule si presentano isolate o riunite a gruppetti di diversi elementi, globose o leggermente ovali. Negli aggruppamenti cellulari accanto a cellule normali si ne osservano spesso altre notevolmente più piccole. Le cellule sono generalmente gemmate, a volte plurigemmate. Le dimensioni del diametro variano da μ 2,8—3,5 fino a μ 5,5—6. Nell'invecchiamento si osservano cellule spesso molto più grandi e con globulo di grasso.

Nel mosto come nel malto si ha dapprima intorbidamento, indi fermentazione attiva e poi deposito; invecchiando la cultura si ha generalmente formazione di anello. Nelle culture per striscio in agar di malto, sia l'aspetto come la disposizione delle cellule non diversifica da quello notato per le

culture allestite sui substrati liquidi. Nelle vecchie culture di oltre venti giorni le cellule assumono forme e dimensioni notevolmente varie; accanto a cellule normali se ne notano altre di dimensioni molto maggiori, molte cellule presentano deformazioni svariatissime ma per lo più mostrano uno o più prolungamenti variamente lunghi e contorti di aspetto molto caratteristico (v. fig. 1). La patina in agar di malto si presenta umida, liscia in centro e scarsamente lobata ad i bordi, di colore bianco.



Fig. 1. ***Torulaspora Rosei.***
Cellule che hanno emesso prolungamenti. (Ingrandimento circa 500.)

La colonia gigante in gelatina di mosto dopo due mesi a 18° si presenta rotonda con cratere centrale, occupante circa la metà della colonia, scarsamente profondo. Dal cratere, mediante variegature o grosse lobature si



Fig. 2. ***Torulaspora Rosei.***
Colonie giganti su gelatina di mosto dopo 2 mesi a 18°. Da sinistra a destra e dall' alto in basso: stipite *64, 65, 66-Zygosacch. globiformis forma tipica 223, 63, 509, 50, 501, 51, 202, 75. 442. 426.* (3/4 Grand. naturale.)

va ad i bordi che si presentano lisci e lobati. Il colore è bianco, l'aspetto ceroso e la gelatina non mostra traccia di liquefazione o rammollimento (v. fig. 2). L'infissione su gelatina di mosto dopo 3 mesi a 18° mostra sviluppo a chiodo con testa screpolata e cresciuta anche lungo il canale d'innesto. La gelatina non è fusa nè rammollita ma fortemente fessurata in seguito a sviluppo di gas.

La ricerca della sporificazione è stata eseguita su agar di malto, agar Gorodkowa, sui blocchetti di gesso e sulla silice gelatinosa (13). La produzione di spore su agar di malto ed anche su agar Gorodkowa è generalmente tardiva ed in ogni caso assai scarsa. Nella silice gelatinosa ma maggiormente sui blocchetti di gesso la sporificazione pur essendo relativamente scarsa, si manifesta, a 25°, asseconda degli stipiti, dopo

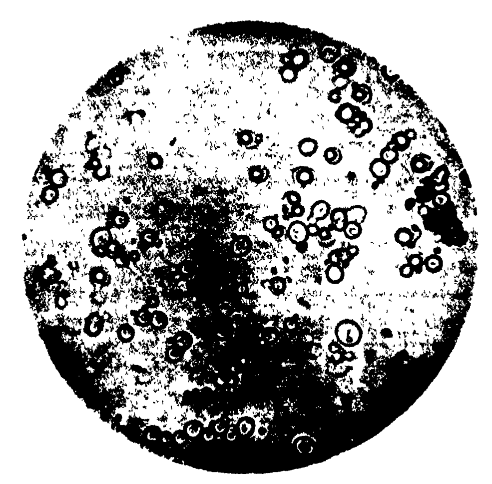


Fig. 3. *Torulaspora Rosei.*
Cultura sporificata (Ingrandimento circa 500).

3—5 giorni. Gli aschi sono sempre partenogenetici e contengono quasi sempre due, molto raramente tre spore, rotonde a parete liscia e con globulo oleoso centrale (v. fig. 3). Gli aschi si presentano quasi sempre ovali e le spore hanno un diametro di μ 2,6—2,8. Sia nella silice gelatinosa e nel gesso ma nell'agar di malto e particolarmente nell'agar Gorodkowa la sporificazione è preceduta da emissione da parte delle cellule, di prolungamenti di numero vario e di dimensioni le più diverse. Detti prolungamenti a volte rimangono come tali, tal'altra due prolungamenti emessi da due cellule vicine sembrano toccarsi; in ogni modo non è stato mai osservato riassorbimento della membrana e quindi formazione di un vero canale di copulazione. Le osservazioni eseguite al riguardo sono state numerosissime, molto accurate e condotte con particolare pazienza. Mai, in nessuno stipite preso in esame, ho notato, nelle condizioni sperimentate, fatti da riportarsi ad una tipica coniugazione.

La fermentabilità degli zuccheri è stata eseguita, sia col sistema Durham come con le provette Einhorn, in brodo di carne col 2% dei rispettivi zuccheri. Tutti gli stipiti, senza eccezione, hanno dimostrato di fermentare glucosio, levulosio, mannosio, saccarosio e raffinosio per 1/3.

Nella nota citata *Sacchetti* riferisce di aver saggiato per *Torulaspora Rosei*, *Zygosacch. globiformis* ed altre specie la capacità a fermentare l'inulina e la destrina. Similmente a quanto ha osservato *Sacchetti*, anch'io ho trovato che tanto *Torulaspora Rosei* quanto *Zygosacch. globiformis* sono capaci di fermentare l'inulina ma non la destrina. Rispetto ai risultati ottenuti da *Sacchetti* sulla fermentazione dell'inulina, i miei stipiti hanno dimostrato una maggiore prontezza nella fermentazione; così produzione di gas col sistema Durham si è avuta dopo 2 giorni per molti stipiti, compreso lo *Zygosacch. globiformis*, e dopo 4 giorni per tutti gli stipiti. Per quanto riguarda la destrina *Sacchetti* riferisce che la fermentazione mentre non si osserva col sistema Durham si svela col metodo delle microfermentazioni di Lindner. Non ho creduto necessario verificare l'asserto di *Sacchetti* poichè i risultati che si ottengono col metodo delle microfermentazioni di Lindner sono fortemente malsicuri e pertanto detto sistema è oggi quasi universalmente non seguito.

L'assimilazione dei nitrati è risultata sempre negativa e lo sviluppo in presenza di alcool etilico è stato sempre molto scarso.

Il potere fermentativo, saggiato su mosto d'uva zuccherato sterilizzato alla pentola di Koch per 40 minuti, senza allontanarne le parti coagulate e precipitate, è risultata abbastanza notevole. Le quantità di alcool formate per gli stipiti di minima e massima attività sono state rispettivamente le seguenti: 7% in peso (8,82% in volume) e 10,60% in peso (13,35% in volume).

Da quanto è stato esposto si possono fare le seguenti considerazioni. La formazione degli aschi nella specie indicata come *Torulaspora Rosei* avviene sempre per partenogenesi e pertanto si ritiene che il genere *Torulaspora* debba essere conservato. Similmente a quanto hanno osservato *Krumbholz* e *Sacchetti* le forme indicate come *Torulaspora Rosei* e *Zygosaccharomyces globiformis* si debbono considerare come appartenenti alla medesima specie. I caratteri riferiti dalla *Stelling-Dekker* per *Torulaspora Rosei* si debbono considerare esatti; l'unica lieve differenza riscontrata riguarda la fluidificazione della gelatina, trovata positiva, sia pure tardivamente, dalla *Stelling-Dekker* mentre negli stipiti da me saggiati e così pure per quello riferito da *Verona* la fluidificazione della gelatina non è stata notata memmeno nelle culture vecchie di tre mesi. Similmente a quanto ha riscontrato *Sacchetti* ed in contrasto con quanto riferisce *Verona* per la sua cultura, gli stipiti da me saggiati sono capaci di fermentare ed anche prontamente l'inulina.

Le mie ricerche portano pertanto alle seguenti conclusioni:

(1) Accurate e pazienti osservazioni sulla maniera di produzione degli aschi, eseguite su 20 stipiti di *Torulaspora Rosei* ed in uno stipite

di *Zygosaccharomyces globiformis*, hanno dimostrato che, nelle condizioni sperimentate, essa è sempre partenogenetica.

(2) Lo studio dei 20 stipiti in questione eseguito parallelamente a quello dello *Zygosaccharomyces globiformis* forma tipica, ha dimostrato che tutte le culture saggiate si debbono considerare come appartenenti alle specie indicata da *Guilliermond* come *Torulaspora Rosei*.

(3) Si conferma il fatto della capacità a fermentare l'inulina da parte della *Torulaspora Rosei*, mentre in contrasto a quanto è stato da alcuni riscontrato e a conferma di quanto è stato da altri riferito, si nota che *Torulaspora Rosei* non possiede la capacità a fluidificare, sia pure tardivamente la gelatina.

Riassunto.

È stato eseguito uno studio su 20 stipiti di *Torulaspora Rosei* ed uno di *Zygosaccharomyces globiformis forma tipica*, specialmente a riguardo della maniera di produzione delle spore. Nelle condizioni sperimentate si è notato che detta produzione è sempre partenogenetica e si conclude pertanto che il genere *Torulaspora* debba essere mantenuto.

Zusammenfassung.

Über die Gültigkeit der Gattung Torulaspora.

An 20 Stämmen von *Torulaspora Rosei* und 1 Stamm von *Zygosaccharomyces globiformis forma typica* wurde insbesondere die Sporenbildung untersucht. Da diese bei jenen immer parthenogenetisch erfolgt, muß die Gattung *Torulaspora* aufrecht erhalten werden.

Bibliografia.

1) *G. de'Rossi*, Rel. IV° Cong. Intern. Vigna e Vino. Lausanne, Agosto 1935, p. 1. — 2) *T. Castelli*, Boll. Ist. Sierot. Milanese. **14**, 911, 1935. — 3) *T. Castelli*, Nuovi Annali dell'Agricoltura XIX, 47, 1939. — 4) *T. Castelli*, Nuovi Annali dell'Agricoltura XIX, 85, 1939. — 5) *F. Carpentieri*, Il Coltivatore e Gior. Vin. Ital. 85°, 275, 1939. — 6) *O. Verona* e *G. Luchetti*, Boll. Ist. Sup. Agrario di Pisa **12**, 236, 1936. — 7) *M. Sacchetti*, L'Industria Saccarifera Italiana **27**, 49, 1934. — 8) *N. M. Stelling-Dekker*, Die Sporogenen Hefen-Uitgave De Koninklijke Akad. Van Wetenschappen. Te Amsterdam, 1931. — 9) *A. Guilliermond*, Annales des Fermentations **2**, 129, 257, 474 et 540, 1937. — 10) *G. Krumbholz*, diese Zeitschr. **4**, 167, 1933. — 11) *G. Krumbholz*, diese Zeitschr. **2**, 411, 1931. — 12) *T. Castelli*, diese Zeitschr. **9**, 449, 1938. — 13) *T. Castelli*, Boll. Ist. Sierot. Milanese. **14**, 954, 1935.

La fermentabilità degli zuccheri è stata eseguita, sia col sistema Durham come con le provette Einhorn, in brodo di carne col 2 % dei rispettivi zuccheri. Tutti gli stipiti, senza eccezione, hanno dimostrato di fermentare glucosio, levulosio, mannosio, saccarosio e raffinosio per 1/3.

Nella nota citata *Sacchetti* riferisce di aver saggiato per *Torulaspora Rosei*, *Zygosacch. globiformis* ed altre specie la capacità a fermentare l'inulina e la destrina. Similmente a quanto ha osservato *Sacchetti*, anch'io ho trovato che tanto *Torulaspora Rosei* quanto *Zygosacch. globiformis* sono capaci di fermentare l'inulina ma non la destrina. Rispetto ai risultati ottenuti da *Sacchetti* sulla fermentazione dell'inulina, i miei stipiti hanno dimostrato una maggiore prontezza nella fermentazione; così produzione di gas col sistema Durham si è avuta dopo 2 giorni per molti stipiti, compreso lo *Zygosacch. globiformis*, e dopo 4 giorni per tutti gli stipiti. Per quanto riguarda la destrina *Sacchetti* riferisce che la fermentazione mentre non si osserva col sistema Durham si svela col metodo delle microfermentazioni di Lindner. Non ho creduto necessario verificare l'asserto di *Sacchetti* poichè i risultati che si ottengono col metodo delle microfermentazioni di Lindner sono fortemente malsicuri e pertanto detto sistema è oggi quasi universalmente non seguito.

L'assimilazione dei nitrati è risultata sempre negativa e lo sviluppo in presenza di alcool etilico è stato sempre molto scarso.

Il potere fermentativo, saggiato su mosto d'uva zuccherato sterilizzato alla pentola di Koch per 40 minuti, senza allontanarne le parti coagulate e precipitate, è risultata abbastanza notevole. Le quantità di alcool formate per gli stipiti di minima e massima attività sono state rispettivamente le seguenti: 7 % in peso (8,82 % in volume) e 10,60 % in peso (13,35 % in volume).

Da quanto è stato esposto si possono fare le seguenti considerazioni. La formazione degli aschi nella specie indicata come *Torulaspora Rosei* avviene sempre per partenogenesi e pertanto si ritiene che il genere *Torulaspora* debba essere conservato. Similmente a quanto hanno osservato *Krumbholz* e *Sacchetti* le forme indicate come *Torulaspora Rosei* e *Zygosaccharomyces globiformis* si debbono considerare come appartenenti alla medesima specie. I caratteri riferiti dalla *Stelling-Dekker* per *Torulaspora Rosei* si debbono considerare esatti; l'unica lieve differenza riscontrata riguarda la fluidificazione della gelatina, trovata positiva, sia pure tardivamente, dalla *Stelling-Dekker* mentre negli stipiti da me saggiati e così pure per quello riferito da *Verona* la fluidificazione della gelatina non è stata notata memmeno nelle culture vecchie di tre mesi. Similmente a quanto ha riscontrato *Sacchetti* ed in contrasto con quanto riferisce *Verona* per la sua cultura, gli stipiti da me saggiati sono capaci di fermentare ed anche prontamente l'inulina.

Le mie ricerche portano pertanto alle seguenti conclusioni:

(1) Accurate e pazienti osservazioni sulla maniera di produzione degli aschi, eseguite su 20 stipiti di *Torulaspora Rosei* ed in uno stipite

di *Zygosaccharomyces globiformis*, hanno dimostrato che, nelle condizioni sperimentate, essa è sempre partenogenetica.

(2) Lo studio dei 20 stipiti in questione eseguito parallelamente a quello dello *Zygosaccharomyces globiformis* forma tipica, ha dimostrato che tutte le culture saggiate si debbono considerare come appartenenti alle specie indicata da *Guilliermond* come *Torulaspora Rosei*.

(3) Si conferma il fatto della capacità a fermentare l'inulina da parte della *Torulaspora Rosei*, mentre in contrasto a quanto è stato da alcuni riscontrato e a conferma di quanto è stato da altri riferito, si nota che *Torulaspora Rosei* non possiede la capacità a fluidificare, sia pure tardivamente la gelatina.

Riassunto.

È stato eseguito uno studio su 20 stipiti di *Torulaspora Rosei* ed uno di *Zygosaccharomyces globiformis forma tipica*, specialmente a riguardo della maniera di produzione delle spore. Nelle condizioni sperimentate si è notato che detta produzione è sempre partenogenetica e si conclude pertanto che il genere *Torulaspora* debba essere mantenuto.

Zusammenfassung.

Über die Gültigkeit der Gattung Torulaspora.

An 20 Stämmen von *Torulaspora Rosei* und 1 Stamm von *Zygosaccharomyces globiformis forma typica* wurde insbesondere die Sporenbildung untersucht. Da diese bei jenen immer parthenogenetisch erfolgt, muß die Gattung *Torulaspora* aufrecht erhalten werden.

Bibliografia.

1) *G. de'Rossi*, Rel. IV° Cong. Intern. Vigna e Vino. Lausanne, Agosto 1935, p. 1. — 2) *T. Castelli*, Boll. Ist. Sierot. Milanese. 14, 911, 1935. — 3) *T. Castelli*, Nuovi Annali dell'Agricoltura XIX, 47, 1939. — 4) *T. Castelli*, Nuovi Annali dell'Agricoltura XIX, 85, 1939. — 5) *F. Carpentieri*, Il Coltivatore e Gior. Vin. Ital. 85°, 275, 1939. — 6) *O. Verona* e *G. Luchetti*, Boll. Ist. Sup. Agrario di Pisa 12, 236, 1936. — 7) *M. Sacchetti*, L'Industria Saccarifera Italiana 27, 49, 1934. — 8) *N. M. Stelling-Dekker*, Die Sporogenen Hefen-Uitgave De Koninklijke Akad. Van Wetenschappen. Te Amsterdam, 1931. — 9) *A. Guilliermond*, Annales des Fermentations 2, 129, 257, 474 et 540, 1937. — 10) *G. Krumbholz*, diese Zeitschr. 4, 167, 1933. — 11) *G. Krumbholz*, diese Zeitschr. 2, 411, 1931. — 12) *T. Castelli*, diese Zeitschr. 9, 449, 1938. — 13) *T. Castelli*, Boll. Ist. Sierot. Milanese. 14, 954, 1935.

(Dal Laboratorio di Microbiologia Agraria e Tecnica della Facoltà Agraria della Regia Università di Perugia.)

Considerazioni sulla Torulopsis pulcherrima.

Per

Tommaso Castelli.

Con 3 figure nel testo.

(Eingegangen am 20. Februar 1940.)

Nelle indagini sui lieviti della fermentazione vinaria che si stanno eseguendo sistematicamente in questo laboratorio si è isolata, molte volte e spesso con un'elevata percentuale di frequenza, la *Torulopsis pulcherrima* (*Lindner*) Saccardo.

Non è compito della presente nota passare in rassegna tutti i lavori che trattano dell'argomento, ritengo però opportuno segnalare i più recenti ed importanti studi apparsi. La *Torulopsis pulcherrima* venne descritta da *Lindner* (1) che la isolò da vari materiali come susine ammostate, dal mosto d'uva e dagli escrementi di un parassita del melo. Anche *Beijerinck* (2) ha riscontrato la *Torulopsis pulcherrima* su vari materiali come mosto d'uva, nel miele, nel nettare dei fiori, nell'aria e negli insetti. La *Torula rubefaciens* descritta da *Grosbüsch* (3) e da questi isolata dalle bucce delle mele, si deve considerare del tutto identica a *Torulopsis pulcherrima*. Nel 1926 *Pollacci* e *Nannizzi* (4) hanno isolato da una lesione epidermica inter-digitale un blastomicete che hanno descritto come *Cryptococcus interdigitalis*, però secondo *Lodder* (5) detta specie si deve considerare come una varietà della *Torulopsis pulcherrima* e stante le differenze sensibili che si notano nelle cellule è stata indicata come *Tor. pulcherrima var. variabilis*. Tra i blastomiceti che naturalmente fanno fermentare il succo di datteri *Melliger* (6) ha riscontrato anche la *Torulopsis pulcherrima*. Recentemente *Porchet* (7) nell'indagine dei lieviti che si riscontrano sulla pellicola di diverse frutta e bacche (ciliegie-fragole-prugne-pere-mele-uva) ha isolato diversi stipiti da riportarsi a *Torulopsis pulcherrima* dei quali ha eseguito un interessante ed accurato studio. Nelle ricerche sugli agenti della fermentazione vinaria nella regione umbra eseguite da *Pulselli* (8) durante le vendemmie del 1924—1925, della *Torulopsis pulcherrima* ne venne ottenuto soltanto uno stipite. Nello studio eseguito nel 1933 da *de'Rossi* (9), al quale portai la mia attiva collaborazione, sempre sugli agenti della fermentazione vinaria nell'Umbria e nel quale vennero presi in considerazione 87 mosti provenienti da diverse località dell'Umbria, su 379 culture complessivamente isolate, 6, presenti in altrettanti mosti, risultarono appartenere a *Torulopsis pulcherrima*. In ricerche microbiologiche su alcuni vini ed uve delle Marche, *Verona* e *Luchetti* (10) hanno isolato 3 stipiti di *Torulopsis pulcherrima* presenti in

2 campioni su un complessivo di 28 esaminati. Un'ampia indagine sui lieviti della fermentazione vinaria nel Chianti classico e zone limitrofe è stata da me eseguita nel 1936 (11); su 93 mosti esaminati e su 525 culture blastomicetiche complessivamente ottenute, la *Torulopsis pulcherrima* venne riscontrata in 16 campioni e cioè con una percentuale del 17,2 %. In ricerche eseguite nel 1937 (12) ancora nella zona del Chianti classico e nelle quali furono presi in considerazione 10 campioni di mosto, già esaminati con le stesse modalità e finalità nel 1936, la *Torulopsis pulcherrima* venne riscontrata in 2 mosti. I reperti ottenuti da *de'Rossi* sui mosti dell'Umbria, di *Verona* e *Luchetti* sui vini ed uve della regione marchigiana, ma particolarmente i miei nei mosti del Chianti classico e zone limitrofe, dimostrano in modo inequivocabile che nel naturale processo fermentativo del mosto d'uva interviene con una frequenza non del tutto trascurabile la *Torulopsis pulcherrima*. Già per gli stipiti isolati nei mosti umbri nelle ricerche eseguite nel 1933 quanto per quelli isolati nella Toscana nelle ricerche fatte nel 1936—1937, ho notato delle differenze abbastanza sensibili specialmente a riguardo di alcuni caratteri. Così mentre lievi diversità sono state notate nell'aspetto dello striscio su agar di malto, queste erano abbastanza sensibili nelle infissioni in gelatina di mosto sia per quanto riguardava l'intensità della fluidificazione della gelatina medesima come del colore che prendeva il liquido, ma differenze anche più sensibili si sono ottenute nella determinazione del potere fermentativo. Già fin dal 1938, allorchè resi noto le ricerche sugli agenti della fermentazione vinaria nel Chianti classico e zone limitrofe, a proposito della *Torulopsis pulcherrima* scrivevo che "lo studio degli stipiti isolati ha dimostrato che tra essi esistono differenze di una certa entità; si rende necessario pertanto sottoporli ad un più accurato e completo studio comparativo". Le ricerche sugli agenti della fermentazione vinaria nel Chianti erano già terminate quando presi visione del ricordato lavoro di *Porchet*. Come già è stato accennato *Porchet* ha indagato su 10 stipiti isolati da diverse frutta ed eseguito ricerche sui caratteri morfologici, su alcuni caratteri culturali, sul potere fermentativo, liquefazione della gelatina, sulla produzione e sulla natura del pigmento ed altri caratteri fisiologici. I risultati delle ricerche della *Porchet* si possono così riassumere: 6 degli stipiti corrispondono esattamente alla diagnosi riportata dalla *Lodder* però contrariamente a quanto questa afferma la produzione di pigmento in *Torulopsis pulcherrima* non dipende dalla presenza di ferro nel substrato di cultura; gli altri 4 stipiti non si possono identificare con la *Torulopsis pulcherrima*, si debbono anzi riportare alle *Mycotoruleae* perchè si ha sviluppo di pseudomicelio e formazione di conidi all'estremità dei prolungamenti cellulari. In questi ultimi stipiti si noterebbero dei fatti di dissociazione e precisamente ogni stipite, proveniente da una cultura unicellulare, verrebbe dissociato nel seguenti due tipi: a) colonie rosse liquefacenti la gelatina, cellule allungate riunite a costituire un pseudomicelio e potere fermentativo più elevato che in b, b) colonie bianche non liquefacenti la gelatina, cellule tonde con grosso globulo di grasso, non si ha formazione di pseudomicelio.

Avendo a mia disposizione molte culture che ad uno studio abbastanza accurato dovevano riportarsi a *Torulopsis pulcherrima* ho creduto interessante sottoporli ad un indagine maggiormente completa e nello stesso tempo ho condotto alcune prove allo scopo di vedere se mi riusciva di ottenere fatti di dissociazione.

Credo opportuno elencare gli stipiti in questione riportandoli col loro numero di collezione e con le indicazioni relative alla data e alla località ove vennero prelevati i mosti dai quali essi furono isolati.

111 (1933) Orvieto (Umbria)
113 (1933) Orvieto (Umbria)
88 (1936) Passignano (Chianti classico-Toscana)
89 (1936) Passignano (Chianti classico-Toscana)
122 (1936) Mugnana (Chianti classico-Toscana)
148 (1936) Strada (Chianti classico-Toscana)
166 (1936) Colognole (Colli fiorentini-Toscana)
181 (1936) Colognole (Colli fiorentini-Toscana)
193 (1936) Colle d'Elsa (Colli senesi-Toscana)
213 (1936) Poggibonsi (Colli senesi-Toscana)
315 (1936) Castellina (Chianti classico-Toscana)
316 (1936) Castellina (Chianti classico-Toscana)
380 (1936) Meleto (Chianti classico-Toscana)
419 (1936) Colli di Brolio (Chianti classico-Toscana)
422 (1936) Colli di Brolio (Chianti classico-Toscana)
434 (1936) Villa a Sesta (Chianti classico-Toscana)
431 (1936) Villa a Sesta (Chianti classico-Toscana)
469 (1936) Montepulciano (Colli senesi-Toscana)
480 (1936) Chiusi (Colli senesi-Toscana)
481b (1936) Chiusi (Colli senesi-Toscana)
487 (1936) Chiusi (Colli senesi-Toscana)
489 (1936) Chiusi (Colli senesi-Toscana)
60 (1937) Gaiole (Chianti classico-Toscana)

Lo studio dei riferiti stipiti è stato eseguito in serie e condotto nella maniera seguente:

L'aspetto delle colonie è stato dedotto da culture allestite in gelatina di mosto dopo 5 giorni a 18°.

I caratteri morfologici (aspetto, dimensioni, aggruppamenti cellulari) sono stati dedotti da culture in mosto d'uva, in decotto di malto e in agar di malto rispettivamente di 24 ore e 3 giorni alla temperatura di 15°.

L'aspetto e la consistenza degli strisci sono stati dedotti da culture allestite in agar di malto, agar Sabouraud glucosato e agar Gorodkowa.

La capacità di sporificazione è stata ricercata su agar Gorodkowa, sui blocchetti di gesso e sulla silice gelatinosa (13).

La liquefazione della gelatina è stata ricercata su infissioni allestite in gelatina di mosto e su colonie giganti ottenute sul medesimo terreno di cultura. Il periodo d'incubazione è stato di 3 mesi e la temperatura 18°.

Circa il potere di coagulazione del latte sono state fatte culture in latte e mantenute alla temperatura di 25° per 20 giorni.

La capacità a fermentare gli zuccheri è stata ricercata ponendo nei tubi Einhorn e Durham del brodo comune di carne con l'aggiunta del 2% di uno dei seguenti zuccheri: glucosio-levulosio-mannosio-galattosio-saccarosio-maltosio-lattosio e raffinosio, periodo di osservazione 10 giorni a temperatura di 25°.

Circa l'assimilazione delle sostanze azotate è stato seguito il metodo auxonografico di *Beijerinck* secondo le indicazioni riportate dalla *Lodder*.

Per lo sviluppo in presenza di alcool etilico sono state seguite le indicazioni della *Stelling-Dekker* (14).

Circa la produzione del pigmento sono stati allestiti terreni di cultura adatti allo sviluppo del blastomicete sia privi di ferro come con aggiunte di piccole quantità di detto elemento. Viene ritenuto generalmente che la produzione di pigmento in *Torulopsis pulcherrima*, come in altri microrganismi, sia legata alla presenza nel materiale di cultura di tracce di ferro; la *Porchet* invece avrebbe osservato che la produzione di pigmento nella *Torulopsis pulcherrima* non è minimamente influenzata dal ferro. Non è compito della presente nota l'indagine sulla natura del pigmento sia nei blastomiceti come nei batteri come la ricerca delle condizioni nelle quali la colorazione si produce (substrato di cultura-temperatura ecc) perchè a questo riguardo esistono numerosissimi ed interessanti lavori di *Lasseur* (15) e della sua scuola (16) come anche quello recente di *Kharasch*, *Conway* e *Bloom* (17). Per le ricerche in proposito mi sono limitato ad osservare l'influenza del ferro ed allo scopo ho preferito fare delle osservazioni su colonie giganti sviluppate nei seguenti agar e mantenute per due mesi alla temperatura di 18°; agar al mosto d'uva (preparato al momento dell'uso mescolando parti uguali di mosto d'uva sterile con agar acqua al 3 % di agar) con e senza il 0,1 ‰ di solfato ferroso — agar di malto con e senza ferro — agar al seguente liquido (acqua 1000-zucchero del commercio 100-solfato ammonico 1-peptone Witte 1-cloruro di sodio 0,5-fosfato bipotassico 1-solfato di manganese 0,1) con e senza traccia di ferro.

Per quanto i risultati verranno riferiti successivamente posso già accennare che i saggi da me eseguiti mi portano alla conclusione che la presenza del ferro giuoca un ruolo predominante nella produzione del pigmento; così ad esempio, tolta una sola eccezione, tutti gli stipiti non hanno presentato pigmento nell'agar malto e nell'agar sintetico senza ferro mentre lo presentavano, più o meno intenso, negli stessi agar contenenti però tracce di solfato ferroso.

L'attività come il potere fermentativo sono stati determinati su 50 ccm di mosto d'uva sterilizzato a 100° senza allontanarne le parti coagulate e precipitate. I 50 ccm di mosto posti in un matraccino da 100 ccm venivano seminati con alcune gocce di una cultura recente ed indi si sostituiva al tappo di cotone una comune valvola di Muller ad acido solforico e si pesava all'esattezza del centigrammo. Le pesate furono poi eseguite dopo 5 giorni ma successivamente di 3 giorni in 3 giorni fino a quando due valori risultarono identici e quindi il fatto fermentativo poteva considerarsi ultimato. La temperatura d'incubazione fu di 18° e la durata dell'esperimento di 30 giorni.

Come è già stato accennato *Porchet* avrebbe notato fenomeni di dissociazione in *Torulopsis pulcherrima* ed i caratteri che riferisce per

il tipo (*b*) corrispondono a quelli che si riportano per *Torulopsis pulcherrima* mentre quelli riferiti per il tipo (*a*) corrispondono a quelli che io ho ottenuto per due stipiti che ritengo siano di una forma da considerarsi come una nuova varietà della *Torulopsis pulcherrima*. Pur non negando che fatti di variazione in *Torulopsis pulcherrima* si possano verificare pur non di meno le prove da me eseguite, con le modalità che ora accenno, mi portano a fatti completamente negativi. Sia per gli stipiti da riportarsi alla tipica *Torulopsis pulcherrima* come per gli altri che considerò come una nuova varietà, sono stati eseguiti ripetuti isolamenti sia adoperando quale substrato la gelatina di mosto (culture d'isolamento per disseminazione) come l'agar di malto (culture d'isolamento per spandimento). In tutte le numerose culture ottenute in tal maniera non ho potuto mai notare differenze sensibili con i caratteri che gli stipiti presentavano inizialmente. Dette ricerche sono state eseguite particolarmente su 3 stipiti e precisamente *111*, *181* e *431*. Così mentre lo stipite *431* è caratterizzato dalla mancanza assoluta di produzione di pigmento e di una lentissima capacità a liquefare la gelatina e di scarso potere fermentativo, lo stipite *181*, che considero assieme al *434* come appartenente alla nuova varietà, è caratterizzato dal presentare un intensa produzione di pigmento, una rapida liquefazione della gelatina ed un potere fermentativo maggiormente elevato; infine lo stipite *111* ha caratteristiche intermedie rispetto a *431* e *181*.

In base ai risultati ottenuti nel presente studio gli stipiti passati in rassegna si possono riportare a due distinti gruppi e precisamente uno che presenta caratteri del tutto identici alla diagnosi stabilita da *Lindner* e in periodo del tutto recente da *Lodder* per *Torulopsis pulcherrima*, che comprende la grande maggioranza delle culture studiate*, e un altro al quale si debbono riportare i due stipiti *181* e *434* che vengono considerati come appartenenti ad una nuova varietà della *Torulopsis pulcherrima* e per la quale viene indicato il nome di „*rubra*". Quanto per gli stipiti da identificarsi con la tipica *Torulopsis pulcherrima* come per quelli appartenenti alla varietà *rubra* si riporta lo studio eseguito iniziando col riferire i caratteri degli stipiti da ritenersi appartenenti alla tipica *Torula*.

Nelle giovani culture in mosto d'uva e nel decotto di malto si hanno, cellule di forma globosa-ovalare di μ 4—5 × 5—6, oppure leggermente allungate di μ 2,8—3,5 × 6—7. Si notano specialmente nell'invecchiamento della cultura cellule molto più grandi per lo più globose contenenti

* Lo stipite *431* per il quale nelle condizioni sperimentate si è notato mancanza della capacità a produrre pigmento e liquefazione molto lenta della gelatina, non può per le dette piccole diversità, differenziarsi dalla *Torulopsis pulcherrima*.

un grosso corpo centrale che spesso occupa quasi completamente la cellula. Le cellule sono isolate o riunite a gruppi di pochi elementi, raramente le cellule sono riunite a costituire un inizio di pseudomicelio, un vero micelio non è stato mai notato. Le culture in mosto ed in malto presentano prima intorbidamento, poi fermentazione e deposito al fondo, invecchiando la cultura si nota un anello bianco sporco, mucoso, con traccia di velo che all'agitazione risale sulle pareti della provetta.

Nell'agar di malto e nell'agar Sabouraud glucosato dopo 3 giorni a 25^0 si notano cellule ovali allungate di μ 2,5—3 $\times$ 4,5—5,5 o cellule globose di μ 7—9 nel diametro con grosso corpo oleoso occupante quasi tutta la cellula (v. fot. 1).

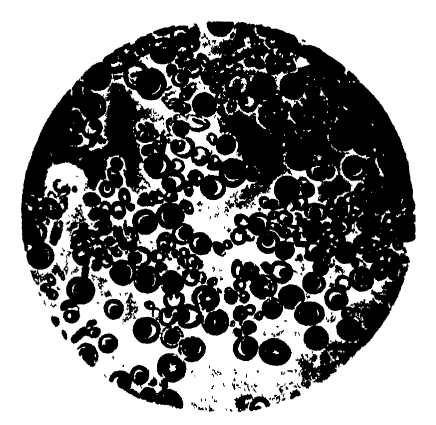


Fig. 1. *Torulopsis pulcherrima.* (Ingrand. ca. 500.)

Nel suddetti agar si hanno patine espanse mucose di colore bianco grigio.

La colonia su gelatina di mosto dopo 3 giorni a 18^0 si presenta rotonda espansa di colore grigio a volte tendente al roseo, al quarto-quinto giorno si ha l'inizio della liquefazione.

La colonia gigante su gelatina di mosto si presenta dopo 5 giorni a 18^0 come un incavo più o meno profondo ripieno di gelatina liquefatta, di colore bianco grigio con riflessi rosei. Nei singoli stipiti si è notata una lieve diversità nella rapidità di liquefazione.

La colonia gigante su agar mosto-agar malto e agar sintetico con o senza aggiunta di piccole quantità di ferro si presenta generalmente molto poco dimostrativa, è rotonda con lievissimo cratere e incavo centrale, la superficie è liscia in centro e così pure ai bordi che si presentano interi o grossolanamente lobati. Circa il colore, mentre lo stipite *431* non ha dato in alcuno dei terreni di cultura produzione di pigmento, tutti gli altri stipiti non hanno prodotto pigmento su agar malto e agar sintetico senza ferro, però sui detti terreni ma contenenti tracce di ferro e su agar mosto, sia con, come senza ferro si è avuta una colorazione rosea più o meno intensa. Il colore non invade mai completamente la colonia, si presenta generalmente in centro ma a volte si nota anche nella parte periferica ed in tal caso è disposto a settori o in maniera varia dando luogo ad aspetti fortemente caratteristici (v. fot. 2a—e).

L'infissione in gelatina di mosto a 18^0 si presenta dapprima come un chiodo di colore dal roseo al rosso granato; la fluidificazione che si

inizia generalmente dopo il quarto giorno è prima ad imbuto, varie volte anche a coppa, poi a cilindro. La liquefazione tende col tempo ad aumentare e dopo un mese mentre alcuni stipiti hanno liquefatto soltanto la metà del substrato altri hanno dato luogo a fluidificazione completa.

Il saggio di sporificazione eseguito diverse volte in tutti gli stipiti sull'agar di malto, sull'agar Gorodkowa, sull'agar Sabouraud glucosato,

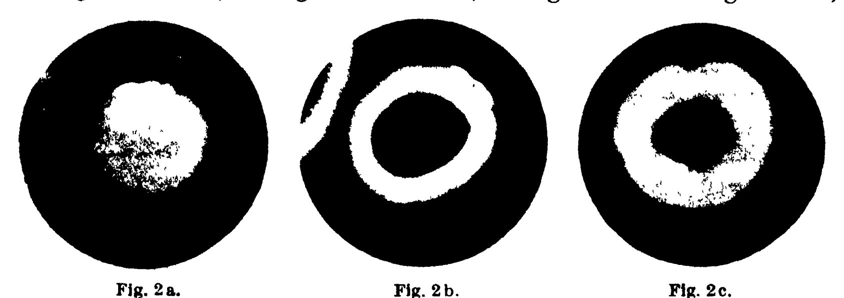


Fig. 2a. Fig. 2b. Fig. 2c.

Fig. 2a. *Torulopsis pulcherrima*. Stipite *431*.
Col gigante su agar malto con ferro (3/4 Grand. naturale).

Fig. 2b. *Torulopsis pulcherrima*. Stipite *193*.
Col. gigante su agar malto con ferro (3/4 Grand. naturale).

Fig. 2c. *Torulopsis pulcherrima*. Stipite *213*.
Col. gigante su agar malto con ferro (3/4 Grand. naturale).

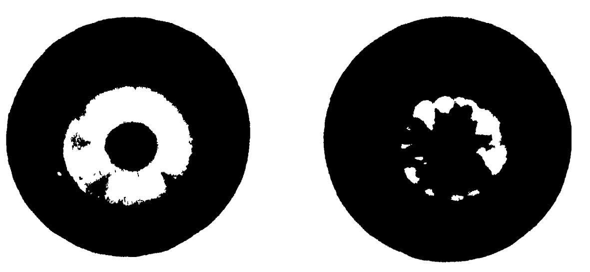


Fig. 2d. Fig. 2e.

Fig. 2d. *Torulopsis pulcherrima*. Stipite *111*.
Col gigante su agar malto con ferro (3/4 Grand. naturale).

Fig. 2e. *Torulopsis pulcherrima*. Stipite *419*.
Col. gigante su agar malto con ferro (3/4 Grand. naturale).

sui blocchetti di gesso e sulla silice gelatinosa, ha dato sempre risultato nettamente negativo*.

* L'unica segnalazione, per quanto mi consta, di presenza di spore in *Torulopsis pulcherrima* è quella di *S. Windisch* (diese Zeitschr. **9**, 551—554, 1938). Il lavoro di *Windisch* si riferisce ad un solo stipite isolato dalle ciliegie e che avrebbe la caratteristica di formare micelio e per il quale in una cultura non pura si sarebbe osservato produzione di spore in seguito a fatti di coniugazione eterogamica e dette spore erano capaci di germinare. Il risultato del lavoro di *Windisch* per il quale come riferisce *Guilliermond* (Boll. Inst. Pasteur **87**, 1188, No. 22) l'A. non presenta alcuna fotografia che possa giustificare il suo veramente strano asserto, deve accettarsi, a mio parere, con molta scarsa fiducia di verità.

Le prove di fermentazione hanno dato risultato nettamente positivo e per tutti gli stipiti per i seguenti zuccheri: glucosio, levulosio, mannosio.

Le culture in latte non modificano minimamente il substrato.

L'assimilazione delle sostanze azotate ha fornito sempre il seguente risultato: buona assimilazione dell'asparagina, discreta per il solfato ammonico e il peptone, nulla per il nitrato di potassio e l'urea.

La crescita in presenza di alcol etilico è stata buona per tutti gli stipiti; dapprima si è notato intorbidamento indi deposito e poi traccia di velo sottile che si rende bene evidente all'agitazione per risalienza sulle pareti del matraccino.

Il potere fermentativo ha dato i seguenti risultati: stipite, *431*, di minima produzione 1,84 % di alcol in peso (2,31 % in volume), stipite, *111*, di massima produzione 3,26 % di alcol in peso (4,10 in volume).

La descrizione fatta permette, conformemente a quanto è stato detto, di riportare detti stipiti alla specie *Torulopsis pulcherrima* (*Lindner*) *Saccardo*. In confronto alla descrizione riportata dalla *Lodder* i miei stipiti presentano una maggiore rapidità nella liquefazione della gelatina ed una mancanza di assimilazione, tra le sostanze azotate, dell'urea.

La forma che indico come *Torulopsis pulcherrima var. rubra* e alla quale si debbono riportare gli stipiti *181* e *434*, presenta i seguenti caratteri.

Nella disseminazione in gelatina di mosto dopo 48 ore a 18° si osservano colonie tonde, gibbose, liscie, umide a margini uniti di colore rosso; molte colonie si presentano già circondate di un alone di liquefazione. Osservate a piccolo ingrandimento l'aspetto è simile a quello descritto. Dopo 5 giorni nella prima e seconda piastra, molto ricche di colonie, la gelatina si presenta completamente fusa ed il liquido presenta un colore rosso intenso con riflessi violacei. Nella terza piastra, ove le colonie sono sufficientemente distanziate, si osservano colonie di colore rosso intenso, fondenti.

In mosto d'uva e nell'infuso di malto dopo 24 ore a 25° si osservano cellule globose ma per lo più allungate di μ 3—4,5 $\times$ 6—8, isolate o a gruppetti non formanti mai micelio. Si notano, ma molto raramente, cellule rotonde con globulo centrale non molto grande. Nell'invecchiamento non si riscontrano sensibili differenze. Dopo 3 giorni sia nel mosto come nel malto si osserva intorbidamento, il liquido tende a presentare dei riflessi rosei mentre in superficie si produce un anello mucoso e un velo sottile di colore roseo.

Nell'agar di malto e nell'agar Sabouraud glucosato dopo 3 giorni a 25° si hanno cellule generalmente di forma allungata delle dimensioni medie di μ 2,5—3 $\times$ 6—6,5. Si osservano cellule più grandi e globose, fino a 10 μ nel diametro, con globulo di grasso non molto grande. Nell'invecchiamento si osservano cellule ovali ellittiche, se ne notano però anche alcune molto grandi le quali contengono spesso due globuli di grasso piccoli, quando si osserva un solo globulo questo è più grande ma non tale da occupare quasi completamente la cellula come si verifica per la tipica *Torulopsis pulcherrima*. La colonia gigante in gelatina di mosto dopo 2 giorni a 18° si presenta come un incavo ripieno, per avvenuta liquefazione della gelatina, di un liquido torbido di colore rosso granato.

Le colonie giganti su agar mosto-agar malto e agar sintetico, sia con come senza ferro si presentano rotonde più o meno espanse, a volte con

piccolo ma poco incavato cratere centrale, la superficie è generalmente liscia e i bordi uniti e grossolanamente lobati. Il colore, meno che in agar malto e in agar sintetico ambedue senza tracce di ferro dove si presenta bianco, è rosso granato più o meno intenso, e a differenza di quanto si è detto per le colonie giganti della tipica *Torulopsis pulcherrima* esso invade tutta la colonia pur notandosi, a volte, una maggiore intensità della colorazione verso la parte centrale.

L'infissione in gelatina di mosto dopo 5 giorni a 28° mostra già evidente fluidificazione ad imbuto ripiena di un liquido mucoso di colore rosso granato. Successivamente la fluidificazione diviene a cilindro e dopo 15 giorni già la metà della gelatina è fluidificata. Dopo 30 giorni la liquefazione è completa, si nota un liquido di colore rosso giallognolo, deposito rosso al fondo ed in superficie anello di colore rosso ed isolotti di velo mucoso roseo.

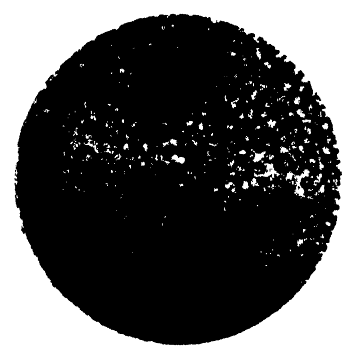


Fig. 3. *Torulopsis pulcherrima var. rubra.* (Ingrand. ca. 450.)

La ricerca della sporificazione ha dato risultato completamente negativo.

La fermentazione degli zuccheri ha dato costantemente risultato positivo per il glucosio, il levulosio e il mannosio.

La cultura in latte non ha mai mostrato sensibile modificazione del substrato. Il saggio di assimilazione delle sostanze azotate ha dimostrato che il germe utilizza molto bene il solfato ammonico e l'asparagina, meno intensamente il peptone, affatto l'urea e il nitrato di potassio.

La cultura in presenza di alcol etilico mostra intorbidamento del liquido che diventa leggermente rossiccio, in fondo al matraccino si ha deposito mentre in superficie si ha una traccia di velo risaliente.

Il potere fermentativo è discreto, la produzione di alcol in peso è del 3,4 % (4,28 % in volume).

In confronto a gli stipiti precedentemente ricordati la cultura ora descritta presenta alcuni caratteri che la diversificano alquanto. Così le cellule mostrano per lo più forma allungata, presentano spesso due piccoli globuli di grasso e quanto ne hanno uno solo questo non invade quasi completamente la cellula. La liquefazione della gelatina è molto più rapida in confronto a quella prodotta dalla tipica *Torulopsis pulcherrima* e così pure il pigmento si presenta molto più intenso e diffuso e anche il potere fermentativo si dimostra maggiormente elevato. Rispetto all'assimilazione delle sostanze azotate non si notano differenze con gli altri stipiti, anche questa cultura non assimila l'urea. Anche per la detta cultura, alla stregua di quanto si è visto per gli stipiti da riportarsi alla tipica *Torulopsis pulcherrima*, sembra che la produzione di pigmento sia legata alla presenza, nel substrato di cultura, di tracce di ferro. Come è stato già accennato i tentativi di ottenere forme dissociate in questa cultura hanno dato risultati negativi in quanto chè non sono state osservate mai forme sostanzialmente differenziabili dallo stipite

iniziale. Le osservazioni fatte mi permettono di differenziare nettamente gli stipiti *181* e *434* da tutte le altre culture per una diversa forma delle cellule, per una maggiore rapidità di liquefazione della gelatina, per una maggiore intensità nella produzione del pigmento e per un più elevato potere fermentativo; detti stipiti vengono pertanto riportati ad una nuova varietà della *Torulopsis pulcherrima* per la quale si propone il nome di „*rubra*'' e per la quale viene stabilita la seguente diagnosi:

Torulopsis pulcherrima var. rubra n. var.

cellule che nelle giovani culture in mosto d'uva e nell'infuso di malto si presentano ovali allungate, isolate o riunite a due o a gruppetti ma non formanti mai micelio, delle dimensioni di μ 3—4,5 × 6—8. In alcune cellule, specie nell'invecchiamento e particolarmente nei substrati di cultura agarizzati si osservano cellule rotonde con 1—2 globuli di grasso che non occupano mai completamente la cellula. Nel mosto d'uva si ha intorbidamento e il liquido tende a divenire leggermente roseo, sia nel mosto come nel malto si ha fermentazione attiva, anello mucoso e velo sottile di colore tenuamente roseo. Fermentazione del glucosio, levulosio e mannosio. Tra le sostanze azotate assimila molto bene il solfato ammonico e l'asparagina meno il peptone e affatto l'urea e il nitrato di potassio. Fluidifica molto rapidamente la gelatina. Sviluppa molto bene in presenza di alcol etilico. Nel substrati contenenti tracce di ferro si ha produzione di pigmento di colore rosso variamente intenso. Le colonie giganti sono poco dimostrative, presentano spesso un cratere centrale poco profondo e bordi grossolanamente lobati. Lo striscio in agar malto presenta patina mucosa, liscia, di colore grigio giallastro. Il potere fermentativo è discreto, la produzione di alcol riscontrata è stata del 3,4 % in peso (4,28 % in volume).

Riassunto.

E stata condotta un'indagine su 23 culture isolate dai mosti dell' Umbria e della Toscana, che dovevano considerarsi da riportare alla *Torulopsis pulcherrima* (*Lindner*) *Saccardo*. Dei 23 stipiti, mentre 21 si possono identificare con la specie sopranominata, gli altri due debbonsi ritenere appartenenti ad una nuova varietà che viene indicata come *Torulopsis pulcherrima var. rubra*.

Zusammenfassung.

Betrachtungen über Torulopsis pulcherrima.

Aus Mosten von Umbrien und Toscana wurden 23 zu *Torulopsis pulcherrima* (*Lindner*) *Saccardo* gehörige Stämme isoliert, von denen

21 als die typische Art zu identifizieren waren (Rötung der Kultur nur bei Gegenwart von Eisen), während 2 Stämme, als *var. rubra n. var.* bezeichnet, sich außer durch andere Eigenschaften auch durch intensivere Farbstoffbildung unterscheiden.

Bibliografia.

1) *P. Lindner*, Wochenschr. f. Brauerei 4, 853, 1887. — 2) *M. W. Beijerinck*, Verz. Geschriften 5, 259, 1921. — 3) *J. Grosbüsch*, Centralbl. f. Bakt. II, 42, 625, 1925. — 4) *G. Pollacci* e *A. Nannizzi*, I miceti patogeni dell'uomo e degli animali 5, No. 44, 1926 [v. 5), p. 144]. — 5) *J. Lodder*, Die Anaskosporogenen Hefen. N. V. Noord-Hollandsche Uitgeversmaatschappij, Amsterdam 1934. — 6) *R. Melliger*, Contribution à l'étude des ferments figurés et des fermentation de la datte. Thèse Universitè de Genève, 1931. — 7) *B. Porchet*, Annales dei fermentations 4, 385, 1938. — 8) *M. Pulselli*, Nuovi Annali dell'Agricoltura VII, 530, 1927. — 9) *G. de'Rossi*, Rel. IV° Cong. Int. della Vigna e del Vino. Lausanne 1935, p. 1. — 10) *O. Verona* e *M. Luchetti*, Boll. R. Ist. Sup. Agrario di Pisa 12, 256, 1936. — 11) *T. Castelli*, Nuovi Annali dell'Agricoltura XIX, 47, 1939. — 12) *T. Castelli*, Nuovi Annali dell'Agricoltura XIX, 85, 1939. — 13) *T. Castelli*, Boll. Ist. Sierot. Milanese 14, 954, 1935. — 14) *N. M. Stelling-Dekker*, Die sporogenen Hefen. Uitgave De Koninklijke Akad. Van Wetenschappen. Te Amsterdam 1931. — 15) *Ph. Lasseur*, C. R. Soc Biol. 74, 496, 1913. — 16) *P. Godfrin*, Contribution à l'étude des Bactéries bleues et violettes. Universitè de Nancy, 1934. — 17) *M. S. Kharasch*, *E. A. Conway* e *W. Bloom*, J. of Bact. 32, 533, 1936.

(Aus der Ersten Medizin. Universitätsklinik der Charité und dem Laboratorium für Elektronenoptik der Siemens & Halske A.-G., Berlin.)

Untersuchungen über Bakterienstrukturen, unter besonderer Berücksichtigung der Bakterienmembran und der Kapsel.

Von

E. Frühbrodt und **H. Ruska.**

Mit 32 Textabbildungen.

(Eingegangen am 18. März 1940.)

I. Aufgabenstellung und Schrifttum.

In früheren Mitteilungen wurde gezeigt, daß es mittels der Übermikroskopie gelingt, sublichtmikroskopische Strukturen an Bakterien abzubilden. Insbesondere wurde die Frage der Nucleoide (*Piekarski*) untersucht und festgestellt, daß in der Massenverteilung der Zelle Gebilde zu finden sind, die in Übereinstimmung mit spezifischen lichtoptischen Untersuchungsergebnissen als Kernäquivalente anzusprechen sind [*G. Piekarski* und *H. Ruska* (33)]. Die Nachweisbarkeit der Nucleoide hat die weitere Erfahrung an den mit *Piekarski* bearbeiteten und anderen Bakterienstämmen immer wieder bestätigt, und es haben sich Kulturbedingungen finden lassen, unter denen sie besonders leicht zur Darstellung kommen. Andererseits aber sind sie — zum mindesten elektronenoptisch — nicht in jedem Zellzustand als besondere Zentren sichtbar, so daß man annehmen muß, daß mitunter erst eine Entmischung zu den wohlgeformten Körpern der Nucleoide führt [vgl. auch *K. Pietschmann* und *A. Rippel* (34)]. Bilder, die wahrscheinlich Stadien solcher Entmischungen darstellen, sind neuerdings von *Tuberkelbazillen* gezeigt worden [*A. Lembke*, *H. Ruska* und *J. Christophersen* (24)] und haben die Erfahrungen über den Bakterienbau wesentlich erweitert.

Mit dem Nachweis der Nucleoide war ein Schritt zu einer zytologischen Differenzierung der Bakterienzelle getan, der über die von *Zettnow* gegebene Unterscheidung von Entoplasma und Ektoplasma hinausging und sich bezüglich der Lokalisation der Träger des Vererbungsvorganges mehr einer Gliederung in Kern und Protoplasma nähert, wie sie andere pflanzliche Zellen aufweisen. Ein Entoplasma im Sinne von *Zettnow*, als Mischung von Kernsubstanz und Protoplasma, liegt in jenen Zellen vor, welchen eine morphologische Scheidung der thymonucleinsäurehaltigen Kernsubstanzen fehlt.

Von Differenzierungen des Ektoplasmas wurden vor den Ergebnissen über die Nucleoide bereits die Geißeln dargestellt (32). Die vor-

liegende Mitteilung soll über Versuche mit Kapselbakterien berichten und sich mit den Beziehungen der Kapsel zum Ektoplasma und zur Bakterienmembran, sowie mit ihrer Struktur befassen. In der umfangreichen Literatur auf Grund lichtoptischer Untersuchungen findet man folgende Anschauungen über diesen Gegenstand.

Nach den auch heute noch nicht als widerlegt geltenden [*T. Wohlfeil* (43)] Ausführungen von *Zettnow* (45) unterscheiden wir am Bakterium eine färberisch darstellbare Kernsubstanz (Chromatin) in Mischung mit Protoplasma, das Entoplasma, und eine nur durch besondere Präparationsmethoden sichtbar werdende äußere Hülle aus einem modifizierten, dichteren Protoplasma, das Ektoplasma. Dieses Ektoplasma ist entweder als Hülle (nicht Kapsel) oder auch in Form von Geißeln ausgebildet. Bei einzelnen *Proteus*-Arten schätzt *Zettnow* die Masse des Ektoplasmas mindestens auf die Hälfte des ganzen Zelleibes. Es soll eine wasserärmere und damit konzentriertere Substanz sein, die auch eine größere Widerstandsfähigkeit gegenüber Färbungen, Plasmolyse usw. besitzt. Das Zurückweichen des Innenkörpers von dem Ektoplasma bei der Plasmolyse sei durch eine genügend feste innere Begrenzungsschicht des Ektoplasmas auf Grund seiner chemischen Differenzierung ermöglicht. *Schaudinn* (40) hat beim riesigen *Bac. Bütschlii* diese Grenzschicht als besondere, doppelt konturierte Zellmembran gefunden, die nach außen direkt in die ektoplasmatische Hülle übergeht. *A. Meyer* (25) gelang bei kleineren Bakterien die Darstellung eines äußeren Zellhäutchens durch Färbemethoden. Im übrigen scheint die Ausbildung einer Membran und einer sie bedeckenden Schleimschicht bei verschiedenen Bakterien sehr verschieden zu sein. *Heim* (18) konnte die Membran am *Bac. cyanogenes* als feine Kontur nachweisen. *Kruse* (23) fand das Auftreten sogenannter „Schatten“, d. h. leerer, scharfkonturierter Zellen in absterbenden Kulturen für eine Membran charakteristisch, aus der das Protoplasma ausgetreten war. *Emmerich* und *Saida* (11) brachten bei *Milzbrandbazillen*, die durch Pyocyanase aufgequollen waren, und *Pane* (31) bei der Autolyse in der Kälte Membranen zur Darstellung. *Gutstein* (16) zeigte durch Beizungs- und Färbeverfahren die isolierte Darstellung oder Kontrastdarstellung des Ektoplasmas. Nach *Gotschlich* (15) ist auch das Ektoplasma der Träger der Gramfestigkeit. Nach *Nakanishi* (28) ist bei *Milzbrandbazillen* und *Staphylokokken* die Membran besonders stark ausgebildet. Bei *Tuberkelbazillen* besteht sie aus ganz besonders widerstandsfähigem Material und enthält Fett und wachsartige Substanzen eingelagert [*Babes* (2), *Knoll* (22), *Bergel* (5)]. [Vgl. damit jedoch die Arbeit von *Lembke, Ruska* u. *Christophersen* (24).]

Bei einzelnen Bakterien treten deutliche, nur mit besonderen Verfahren färbbare, außerhalb der Membran liegende Kapseln auf. *Binaghi* (6) sieht in der Kapsel das Produkt einer biochemischen Tätigkeit des Bakteriums und glaubt, daß sie durch Anschwellung seiner äußeren Schicht entsteht. Auch nach *Gotschlich* (15), der wie einige andere Autoren die Membran mit dem Ektoplasma weitgehend identifiziert, ist die Kapsel durch Aufquellung des Ektoplasmas entstanden und sogar bei allen Bakterien vorhanden. Wenn sie bei bestimmten Arten quantitativ stärker hervortritt, insbesondere bei den sogenannten Kapselbakterien im infizierten Organismus, so ist dies als Schutzmaßnahme gegen die bakterienfeindlichen, zerstörenden Einflüsse (Alexine, Plakine, Leucine) zu erklären; denn es geht mit dieser aktiven Reaktion eine Steigerung der Virulenz und Serumfestigkeit einher

[Bakterienimmunität durch strukturelle Anpassung, *Sauerbeck* (39)]. Außerhalb des Tierkörpers kann die Kapselbildung durch Immunserum, hohen Zuckergehalt, Arsenik usw. als Zusätze für Nährböden angeregt werden. Kapseln wurden nachgewiesen durch *Noetzel* (29) an *Staphylo-* und *Streptokokken* mit verdünnter Kalilauge; von *Babes* (1) am *Typhuserreger* durch *Löfflers* Geißelfärbung; durch *Zettnow* (46) am *Pestbazillus*; von *Bunge* (10) bei *Coli, Typhus* und *Proteus*; von *Unna* (42) bei den *Tuberkel-* und *Leprabazillen* als rote Hüllen mit Kernresten; von *Johne* (21) und vielen anderen beim *Milzbrand*. Mit der Frage der *Milzbrand*-Kapsel befaßten sich besonders eingehend *A. Fischer* (13) und auf Anregung von *v. Baumgarten W. Enderle* (12), auf deren Auffassungen noch zurückzukommen ist.

Fürst (14), *Heim* (19), *Töniessen* (41) unterscheiden an der Kapsel zwei Schichten: Die innere lebenswichtigere als Ektoplasmaanteil und die äußere als diffuses Sekretionsprodukt ohne eine scharfe äußere Kapselmembran. Nach *Bail* (3) erfolgt der Übergang des Bakteriums in die Kapselschicht fließend, d. h. ohne Membran, während *Woloschin* (44) an Hand der Beobachtung von Leerkapseln eine innere scharfe Begrenzung hervorhebt. *Baumgärtel* (4) behauptet die Anwesenheit einer stark lichtbrechenden Zellhaut. Nach *Bail* (3) ist die Grenze der Kapseln gegen die Umgebung im lebenden Zustande der Bazillen immer eine scharfe, Fortsätze oder amöboide Auswüchse lassen sich nicht beobachten. Er findet im gefärbten Präparat bei langer Färbung mit verdünnten Lösungen keine äußere Grenzmembran, wohl aber bei brüskerer Färbung. Bei Bakterien in eiweißhaltigen Flüssigkeiten findet er unter anderem auch Kapseln mit pseudopodienartigen, spitzen Fortsätzen versehen, hält diese aber für Kunstprodukte.

Fürst (14) unterscheidet die Kapseln als einen aus dem Zellplasma differenzierten Bakterienanteil und außerdem eine Hülle von umgebendem Nährmedium, die aus radiärer gestellten feinsten Körnchen bestehen soll. Die Kohäsion zwischen beiden ist so stark, daß ein mehrmaliges Waschen in physiologischer Kochsalzlösung ohne Schaden vertragen wird. *Woloschin* (44) behauptet, eine radiäre Streifung nachgewiesen zu haben. *Ottolenghi* (30) sah eine Netzstruktur, die er aber für eine unregelmäßige, künstliche Aufquellung des Ektoplasmas hält. *Babes* (1) findet beim *Friedländer-Bakterium* eine konzentrische Schichtung der Kapsel. *Hinterberger* (20) sah auf Grund versilberter Präparate radiäre Faltungen und geißelartige Fortsätze. Radiäre oder ungefähr radiäre Streifungen bildet auch *Töniessen* (41) ab. *Ottolenghi* (30) fand bei Safraninfärbung ebenfalls radiäre Lagerung. *Woloschin* (44) bildet außerdem unregelmäßige, grobe Wabennetze ab und sieht innerhalb der Kapseln sogar Vorstufen der Sporenbildung, wie er auch diese als eine Art Sporangium ansieht und die innerhalb der Kapsel vorkommenden Zerfallsprodukte des Entoplasmas als färbbare Sporen oder deren Auskeimungen. *Hinterberger* (20) beschrieb in der Interzellularsubstanz eine ganz feine netzartige Struktur, die in der Nähe der Bakterienleiber Ähnlichkeit mit Geißelbildungen hat. *Migula* (26) hat Schleimfäden beobachtet, die von der quellenden Membran ausgehen. Ebenso konnten *Hinterberger* (20) und *Hamm* (17) bei gewissen Manipulationen Schleimfäden und Pseudogeißeln am Rande der Kapseln erhalten. Die Kapsel hat nach ihrer Meinung außen keine scharfe Grenzmembran.

Das Gesamtergebnis der zahlreichen lichtoptischen Untersuchungen ist uneinheitlich. Die Existenz einer Membran scheint manchen Autoren auch heute noch nicht mit Sicherheit erwiesen [*R. Müller* (27)]. Wesen

und Zugehörigkeit der Kapsel wird verschieden betrachtet, ihr Vorkommen, ihre Struktur, ihre innere und äußere Begrenzung werden verschieden beschrieben.

II. Material und Voruntersuchungen.

Für unsere Untersuchungen verwendeten wir als typische Vertreter kapselbildender Bakterien jeweils verschiedene Stämme von *Streptococcus lanceolatus* Typ *I*, *II* und *III*, *Bacillus pneumoniae* und *Bacillus anthracis*. Außerdem werden Beobachtungen an einigen anderen Keimen herangezogen.

Als Nährböden dienten Nährbouillon, Agar und Blutagar, für die Tierversuche weiße Mäuse, die wir meist intraperitoneal infizierten. Bei den aus Tierversuchen zur Gewinnung von Kapseln isolierten Bakterien wurde bakterienhaltiges Peritonealexsudat oder Blut sorgfältig in destilliertem Wasser fraktioniert zentrifugiert, bis die Bakterien von Salzen, Eiweiß, Blut- und Exsudatzellen befreit waren. Ebenso wurde mit Keimen aus Bouillon verfahren. Die Beobachtung und Abbildung unserer Präparate erfolgte lichtoptisch an ungefärbten Präparaten, nach Färbung mit Fuchsin, unter Anwendung der Kapselfärbung nach *Johne* und im Tusche- bzw. Kollargolpräparat. Die elektronenoptischen Aufnahmen wurden mit dem Siemens-Übermikroskop nach *E. Ruska* und *B. v. Borries* (9) angefertigt, wobei daran erinnert sei, daß die übermikroskopischen Bilder die Massenverteilung der Objekte wiedergeben (8). Die Kulturbakterien wurden in der früher beschriebenen Weise aus wässrigen Suspensionen auf Zaponlackfilmen aufgetrocknet (35, 33), die Bakterien aus dem Tierkörper nach der Reinigung. Welche Untersuchungsverfahren bei der Übermikroskopie in Frage kommen, haben wir an anderer Stelle ausführlich dargestellt (37). Die Bilder sind in Originalgröße reproduziert.

Zur Kritik unserer Methoden sei betont, daß die elektronenoptische Untersuchung der Bakterien ohne Färbung erfolgt. Dadurch entfallen Anlagerungen von Farbteilchen an der Bakterienoberfläche, die zu Täuschungen über die Außenkontur führen können. Andererseits kann möglicherweise das Waschen der Bakterien in destilliertem Wasser, das Auftrocknen auf dem Film, das Vakuum und die Elektronenbestrahlung Membran und Kapsel ändern. Nach *Fürst* (14) wird durch mehrfaches Waschen in physiologischer Kochsalzlösung die Kapsel nicht angegriffen. Bei unseren Versuchen blieb bei *Pneumokokken* und besonders bei *Pneumobazillen* auch beim Waschen mit destilliertem Wasser die Kapsel erhalten. Die Auftrocknung kann bei der Art unserer Untersuchung keine anderen Veränderungen hervorrufen als im lichtoptischen Präparat, es entfällt zudem beim übermikroskopischen Präparat die Fixierung. Veränderungen durch die Bestrahlung können auf dem Leuchtschirm sofort beobachtet werden, sie sind an der Kapsel von uns nicht gesehen worden, dagegen nach intensiver Bestrahlung an Nucleoiden, an den Granula der *Tuberkelbazillen* (24) und bei Untersuchungen

über die bakteriophage Lyse (36). Die auch bei schwacher Bestrahlung eintretende Abtötung der Bakterien erfolgt ohne sichtbare Strukturveränderungen.

Zu prüfen war noch der Einfluß des Vakuums auf Form, Größe und Lebensfähigkeit der Bakterien.

Zunächst wurde das Verhalten von Bakterien untersucht, die nach der üblichen Methode in einer Aufschwemmung mit Aq. dest. auf einem Deckglas aufgetrocknet wurden. Das Deckglas wurde dreimal durch die Flamme gezogen und mit der Bakterienschicht nach dem Innenraum einer Hochvakuumkammer gewendet vakuumdicht aufgesetzt. Der Druck betrug nach dem Auspumpen in der Regel 2 mm Hg, in einzelnen Fällen wurden die Keime auch 10^{-5} mm Hg ausgesetzt. Die Vakuumkammer ist ähnlich der Feuchtkammer des Mikromanipulators so konstruiert, daß sie die lichtmikroskopische Beobachtung des Objektes während der Herstellung und Aufrechterhaltung des Vakuums bei hohen Vergrößerungen ermöglicht. Während einer 5 Minuten andauernden Exponierung im Vakuum trat keine Änderung der Größe oder der Form der Bakterien ein. Derselbe Versuch wurde nun mit unfixierten Bakterien wiederholt. Bei der Beobachtung während des Auspumpens war keine plötzliche Größenänderung zu sehen, mitunter schien jedoch nach 5 Minuten Einwirkung eine ganz minimale nicht sicher meßbare Verkleinerung feststellbar. In keinem Falle jedoch war die Schrumpfung größer als sie bei der Fixierung in der Flamme eintritt. Es besteht umrißmäßig nach der Vakuumbehandlung kein sichtbarer Unterschied zwischen fixierten und unfixierten Bakterien.

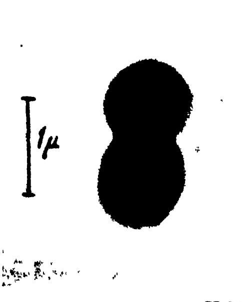
Es war aber noch die Frage zu beantworten, ob bei den unfixierten also noch lebenden Stämmen sich nicht Störungen in der Vermehrungsfähigkeit eingestellt hatten. Deshalb wurde auf die aufgetrockneten Bakterien nach der Vakuumbehandlung ein Tropfen steriler Nährbouillon aufgetragen und aus der Vakuumkammer eine feuchte Kammer hergestellt. Es zeigte sich danach ein absolut normales Wachstum des betreffenden Stammes. Bei *Sarcina tetragena* war das Wachstum sogar nach sechsstündiger ununterbrochener Exponierung in der Vakuumkammer bei angeschlossener Pumpe noch erhalten. In einer anderen Versuchsfolge wurden Bakterienaufschwemmungen auf dünne Deckglas-Agarnährböden aufgetrocknet und für 5 bis 7 Stunden in das Vakuum eingebracht. Auch diese Kulturen gingen nachher in der feuchten Kammer an. Das Wachstum wurde lichtoptisch kontrolliert. Versuche, Bakterien in Nährbouillon aufzutrocknen und ebenso dem Vakuum auszusetzen, ergaben das gleiche Resultat. Damit erscheint ein tiefgehender Einfluß der Vakuumbehandlung, d. h. der Trocknung und Entquellung nicht nur auf die Struktur, sondern auch auf die Lebensfähigkeit ausgeschlossen.

III. Die übermikroskopischen Bilder.

Die untersuchten Bakterien: *Pneumokokken*, *Pneumobazillen* und *Milzbrandbazillen* bilden auf den üblichen Kulturnährböden in der Regel keine typischen Kapseln, wohl aber im parasitierenden Zustand im Tierkörper. Beide Formen werden in den folgenden Bildern verglichen.

a) Streptococcus lanceolatus.

In Abb. 1 vom Typ *I* des *Streptococcus lanceolatus* läßt sich ein zentraler dunkler Teil erkennen, der sich nach dem Rande zu etwas



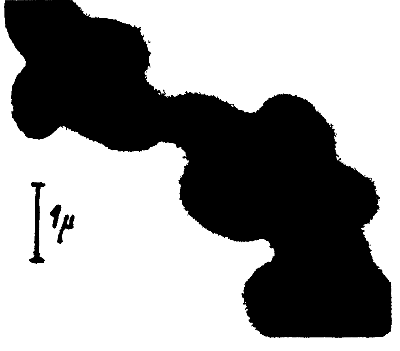
II 516/39
Abb. 1. *Streptococcus lanceolatus*, Typ *I*, 24stündige Kultur auf Blutagarplatte el. opt. 13000 : 1.



II 517/39
Abb. 2. Dunkelfeldaufnahme des gleichen Diplococcus wie Abb. 1, el. opt. 13000 : 1.



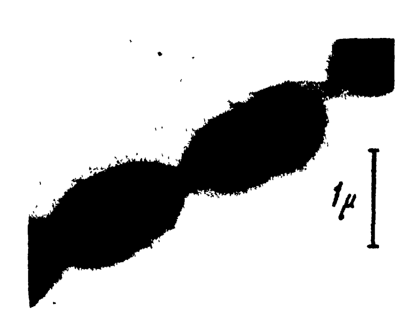
II 532/39
Abb. 3. *Streptococcus lanceolatus*, Typ *I*, 48stündige Kultur auf Blutagarplatte el. opt. 13000 : 1.



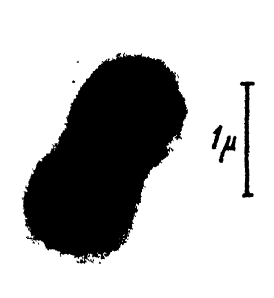
II 541/39
Abb. 4. *Streptococcus lanceolatus*, Typ *II*, 8stündige Kultur auf Blutagarplatte el. opt. 10000 : 1.

aufhellt. Er ist dicht umschlossen von einer schmalen, dunklen, membranartigen Schicht, die sich nach außen schärfer als nach innen abhebt. Ihr folgt eine helle, breitere Zone, an deren Außenseite kleine Teilchen angelagert sind. Ähnlich erkennt man die Schichtung auch im Dunkel-

feld (Abb. 2). Dieses Bild einer mehrschichtigen Außenbegrenzung wiederholt sich mit wechselnder Breite der einzelnen Zonen bei allen Kulturpneumokokken immer wieder (Abb. 3, 4). Die membranartige Schicht sieht man besonders deutlich als schwarze Begrenzungslinie zwischen den zusammenstoßenden Diplokokkengruppen auf Abb. 4, Typ *II*. Sie fehlt jedoch an der Teilungslinie zwischen den Einzelkokken. Abb. 5, Typ *III* zeigt die membranartige Schicht auch zwischen den



II 541/39
Abb. 5. *Streptococcus lanceolatus*, Typ *III*, 18stündige Kultur auf Blutagarplatte el. opt. 13000 : 1.



II 450/39
Abb. 6. *Streptococcus lanceolatus*, Typ *III*, 48stündige Kultur auf Blutagarplatte el. opt. 15000 : 1.

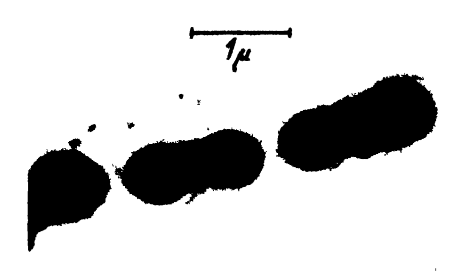


Abb. 7. II 514/39
Streptococcus lanceolatus, Typ *III*, 48stündige Kultur auf Blutagarplatte el. opt. 13000 : 1.

Einzelkokken sehr ausgeprägt. Die Aufhellung zwischen dem zentralen Teil und der „Membran" ist hier und in Abb. 6 breiter und deutlicher als in Abb. 1, der Innenkörper etwas heller. Zum Teil sind diese Unterschiede abhängig vom Härtegrad des photographischen Abzugs, sie liegen aber auch zweifellos an den Bakterien selbst. Den größten Abstand zwischen Innenkörper und Membran zeigt Abb. 7; er kann andererseits auch sehr klein sein (Abb. 8, 9) oder völlig verschwinden (Abb. 10, 11). Um die Zellen der Abb. 8 bis 11 zeigt sich in verschiedener Ausprägung eine mehr oder weniger körnig-flockige Anlagerung außerhalb der Mem-

bran. Ihre Begrenzung nach außen ist unscharf und zeigt einen allmählichen Übergang zum strukturlosen Kollodiumfilm, der die Bakterien trägt. Die lichtoptische Vergleichsaufnahme des gleichen Stammes, des schleimig wachsenden Typus *III*, läßt die Zellen mit einem hellen Hof

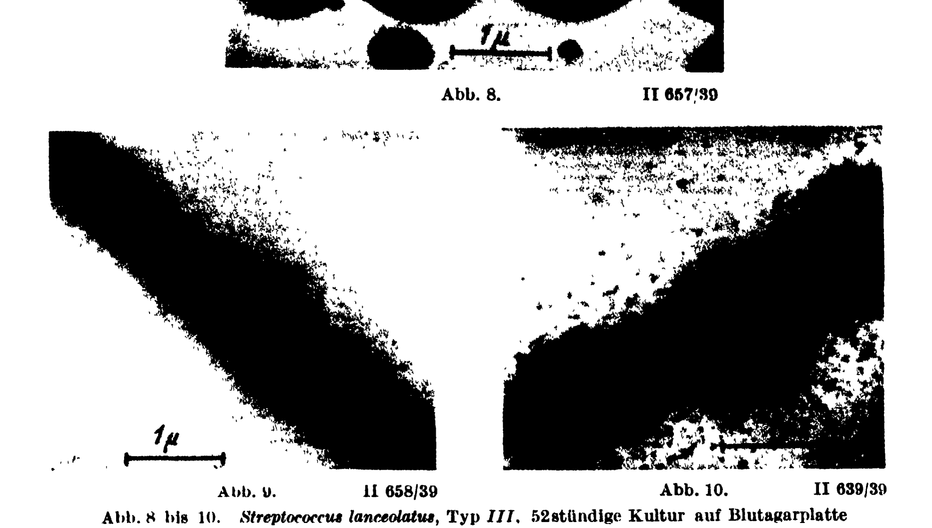
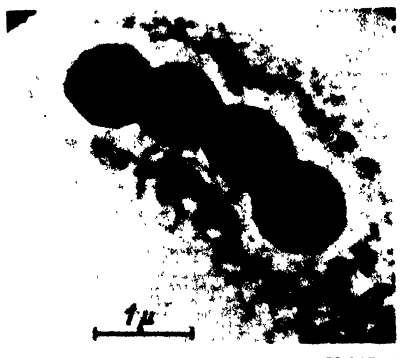


Abb. 8. II 657/39

Abb. 9. II 658/39 Abb. 10. II 639/39

Abb. 8 bis 10. *Streptococcus lanceolatus*, Typ *III*, 52stündige Kultur auf Blutagarplatte el. opt. 13000 : 1 und 18000 : 1.

erscheinen (Abb. 12). Außerhalb des Hofes liegen schleimige Substanzen, die sich auch zwischen den Kokkengruppen hinziehen. Sie sind elektronenoptisch (Abb. 11) und lichtoptisch (Abb. 12) in der gleichen La-



II 512/39

Abb. 11. *Streptococcus lanceolatus*, Typ *III*, 48stündige Kultur auf Blutagarplatte el. opt. 13000 : 1.

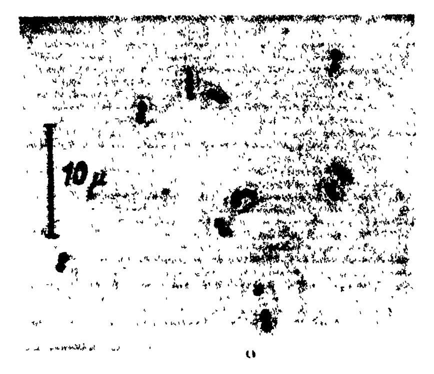
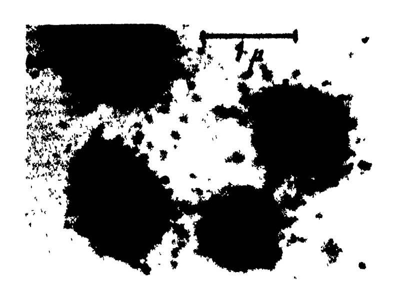


Abb. 12. *Streptococcus lanceolatus*, Typ *III*, 72stündige Kultur auf Blutagarplatte, gefärbt mit alkoholisch-wässriger Fuchsinlösung, lichtoptisch 1500 : 1.

gerung um die Bakterien zu sehen. Der helle Hof erscheint lichtoptisch als eine in der Kultur gebildete „Kapsel", elektronenoptisch als eine Zone, in der die Schleimsubstanzen sehr wasserreich sind und daher nach dem Auftrocknen die Bakteriengruppe besonders locker umgeben. Die aus Blut und Peritonealexsudat gewonnenen *Pneumokokken* zeigen ähnliche körnige Substanzen auf der Zelloberfläche (Abb. 13, 14). Der



II 870/39
Abb. 13. *Streptococcus lanceolatus*, Typ *II*, aus Mäuseblut isoliert el. opt. 12000 : 1.



II 872/39
Abb. 14. *Streptococcus lanceolatus*, Typ *II*, aus Peritonealexsudat isoliert el. opt. 12000 : 1.

Zusammenhang zwischen den Kapselsubstanzen und der Bakterienzelle ist dabei überraschend locker, scheint oft sogar völlig zu fehlen. Trotzdem haften die Substanzen nach dreimaligem Waschen noch an den Zellen fest. An ihrer Zugehörigkeit zu den Bakterien könnte man zweifeln, wenn nicht entsprechende Versuche mit *Pneumobazillen* grundsätzlich ähnliche, jedoch bezüglich der Zugehörigkeit der Kapselsubstanzen zur Bakterienzelle viel deutlichere Bilder ergeben hätten.

b) *Bacillus pneumoniae.*

Die *Pneumobazillen* aus Agarkulturen zeigen die für *Pneumokokken* charakteristische mehrschichtige Außenbegrenzung nicht. Zellen aus

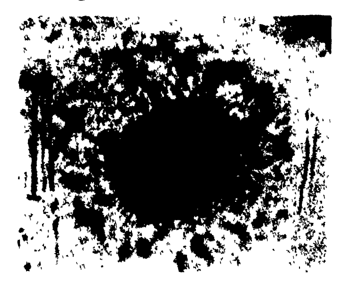


II 605/39
Abb. 15. *Bacillus pneumoniae*, 12tägige Kultur auf Agarplatte el. opt. 14000 : 1.



II 577/39
Abb. 16. *Bacillus pneumoniae*, 28tägige Kultur auf Agarplatte, el. opt. 14000 : 1.

jungen Kulturen erscheinen scharf begrenzt, häufig mit zentralen oder polaren Aufhellungen. In älteren Kulturen findet man daneben „Bakterienschatten" (Abb. 15) und schließlich körnige Formen (Abb. 16). Nur selten fanden wir in Kulturen Formen, deren Außenzonen an die Schleim- und Kapselbildung der *Pneumokokken* erinnerte (Abb. 17).



II 731/39

Abb. 17. *Bacillus pneumoniae*, 26tägige Kultur auf Agarplatte, el. opt. 15000 : 1.

Die Struktur der aus dem Tierkörper gewonnenen *Pneumobazillen* ist eine völlig andere als die der Kulturbakterien (Abb. 18 bis 23). Die

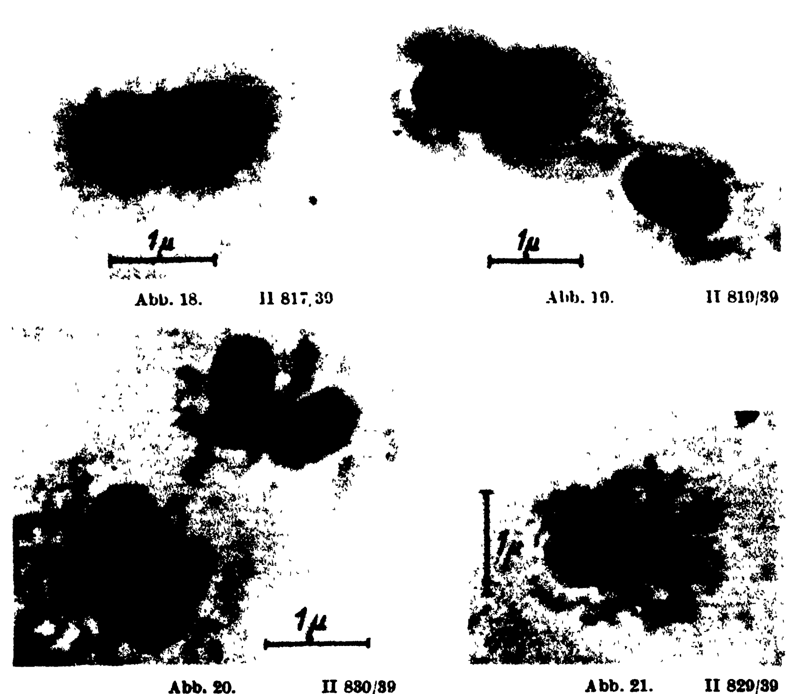


Abb. 18. II 817/39 Abb. 19. II 819/39

Abb. 20. II 830/39 Abb. 21. II 829/39

Abb. 18 bis 21. *Bacillus pneumoniae* aus Mäuseblut isoliert el. opt. 14000 : 1 und 12000 : 1.

Zellen erscheinen untereinander gleichartiger und zeigen häufig einen oder während der Teilung zwei deutliche, durch ihre größere Dichte hervortretenden Inhaltskörper (Abb. 18, 19, 20). Diese liegen diagonal zur Längsachse der Bazillen oder Doppelbazillen. Die deutlichen Beziehungen zum Teilungsvorgang ermöglichen mit hoher Wahrscheinlichkeit sie als „Nucleoide“ anzusprechen. Um den Bakterienkörper sieht man in größerer oder geringerer Breite die Kapselsubstanz. Sie bricht nach außen unregelmäßig, ohne scharfe Begrenzung ab. Die Anordnung der krümeligen Masse ist häufig deutlich radiär-(Abb. 20, 21).

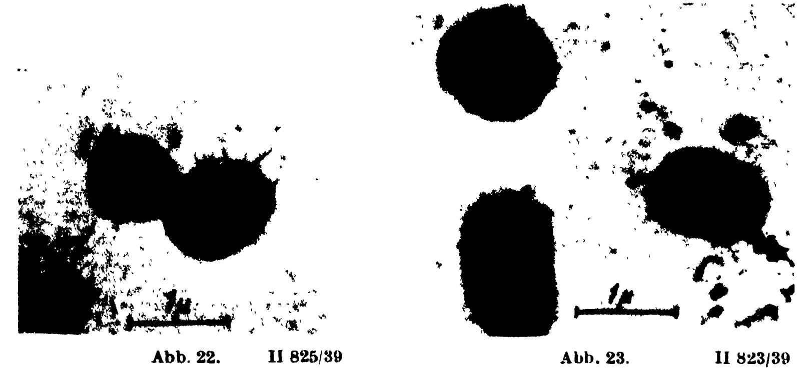


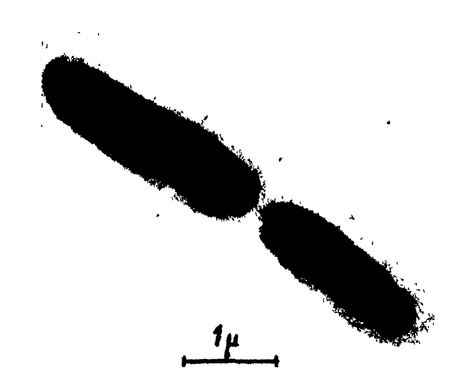
Abb. 22. II 825/39 Abb. 23. II 823/39

Abb. 22 und 23. *Bacillus pneumoniae* aus Peritonealexsudat isoliert el. opt. 13000 : 1.

Wir deuten dies als Folge einer durch die Bakterienoberfläche erfolgenden allseitigen Abscheidung. Auch dann, wenn die Radiärstruktur erst durch die Auftrocknung zustande kommen sollte, zeigt sie doch eine vorgebildete Lagerung und Ausrichtung der Kapselsubstanzen an. Mitunter sind innerhalb der Kapsel beträchtliche Lücken. Man sieht dann die Bakterienoberfläche scharf konturiert vorliegen, keineswegs gequollen und keinen allmählichen Übergang zur Kapsel bildend. Sind die Kapseln durch Waschen der Bakterien völlig abgelöst (Abb. 22, 23), so ist ebenfalls die scharfe Zellbegrenzung deutlich, darüber hinaus sieht man einen feinen „Strahlenkranz“, wie er früher schon (33, Abb. 9 und 17b; 38) bei *B. prodigiosum* und *Sarcina alba* beschrieben wurde.

c) *Bacillus anthracis.*

Als Sporenbildner zeigt der *Milzbrandbazillus* in der Kultur eine von den bisher beschriebenen Keimen stark abweichende Morphologie. Vor der Sporenentwicklung, auf deren Probleme hier nicht ins Einzelne gehend eingegangen werden soll, ist eine deutlich abgesetzte Membran um einen dichten Bakterienkörper sichtbar (Abb. 24 u. 29). Der große Abstand zwischen dem Innenkörper und der Membran erinnert an Abb. 7 der *Pneumokokken*. Mit der Ausreifung der Sporen nimmt die



II 100/40

Abb. 24. *Bacillus anthracis*, 28tägige, bei Zimmertemperatur gewachsene Kultur auf Agarplatte el. opt. 12000 : 1.

Abb. 25. II 93/40

Abb. 26. II 91/40

Abb. 27. II 84/40

Abb. 28. II 98/40

Abb. 25 bis 28. *Bacillus anthracis*, verschiedene Stadien der Sporenbildung in Kultur auf Agarplatte el. opt 10000 : 1.

Dichte und Ausdehnung der Innenkörper ab (Abb. 25, 26, 27), bis nach deren Freiwerden leere Membranen übrig bleiben (Abb. 28, 29). Dabei ist bemerkenswert, daß sich polar liegende, manchmal klappenartige Öffnungen in der Membran bilden, die offenbar die Spore austreten lassen (Abb. 25 bis 29). Lichtoptisch kann durch den Abstand zwischen Innenkörper und Membran eine Kapsel vorgetäuscht werden. Elektronenoptisch ist keine Kapsel sichtbar. Echte Kapseln sollte man auch beim *Milzbrandbazillus* im Tierversuch erwarten. Entsprechende Versuche mit einem mäusepathogenen Milzbrandstamm haben jedoch



II 95/40

Abb. 29. *Bacillus anthracis*, „leere Bakterienmembran" el. opt. 12000 : 1.

immer nur gut begrenzte, kapsellose, meist homogen dichte Bakterienformen in Blut und Peritonealexsudat gezeigt. Es muß also bei der Waschprozedur die Kapselsubstanz entfernt worden sein, oder es fehlt dem *Milzbrandbazillus*, entgegen den herrschenden Anschauungen, die bei *Pneumoniebazillen* beschriebene echte Kapsel.

IV. Besprechung der Ergebnisse.

Die Untersuchungen an kapselbildenden Bakterien, und zwar an Kokken, nicht sporenbildenden und sporenbildenden Stäbchen, haben es ermöglicht, strittige Fragen über den cytologischen Feinbau dieser Keime zu klären und neuartige Befunde zu erheben. Im parasitierenden Zustand zeigen die *Pneumobazillen* in ihrem Cytoplasma wohl ausgebildete Nucleoide. Ihre Durchmesser betragen etwa 60 bis 160 mμ, so daß sie nur mittels der Übermikroskopie genau nachweisbar sind. Die Einteilung des Bakteriencytoplasmas in Entoplasma und Ektoplasma (*Zettnow*) erscheint nicht streng durchführbar, zwischen beiden ist eine scharfe Grenze (*Schaudinn*) nicht nachweisbar. Die Vorstellung, daß die ektoplasmatische Zone dichter sei als das Entoplasma findet in

den elektronenoptischen Bildern keine Stütze, dies gilt höchstens von der außerordentlich dünnen Membran[1]. An zahlreichen Bakterien (*Dysenterie-*, *Bang-*, *Coli-*, *Paratyphus-*, *Prodigiosus*-Bakterien u. a.) wurde schon früher (7, 32, 33) gezeigt, daß die äußeren Cytoplasmateile häufig eine geringere Dichte aufweisen als das Zellinnere. Die gleichen Befunde wurden zum Teil an *Pneumokokken* und *Pneumobazillen* (Abb. 7, 21) und mit großer Regelmäßigkeit an *Milzbrandbakterien* erhoben. Auch bei den Erregern der Tuberkulose (24) und Aktinomykose (Abb. 30) sieht man deutlich die geringere Dichte der äußeren Cytoplasmateile.



Abb. 30. II 509|39

Aktionomyces bovis, 20tägige anaerobe Kultur auf Fortner-Platte el. opt. 13000 : 1.

Während eine genaue Grenzziehung zwischen Entoplasma und Ektoplasma unmöglich erscheint, ist die Begrenzung des Bakterienkörpers, d. h. des Ektoplasmas nach außen immer scharf und erscheint häufig als konturartige Linie von etwa 8 bis 20 mμ Breite. Sie tritt besonders dann deutlich hervor, wenn zwischen dieser Linie und dem dichten Bakterieninnern ein breiterer, wenig massendichter Teil liegt. Wahrscheinlich handelt es sich bei manchen Bakterienformen dabei um Lücken, die durch Schrumpfung des Cytoplasmas zustande kommen. Die Beobachtungen sprechen jedenfalls für das Vorliegen einer Membran, deren Wandstärke so gering ist, daß sie der direkten lichtoptischen

---

[1] *Anmerkung bei der Korrektur. A. Jakob* u. *H. Mahl* (Jahrb. d. AEG-Forschung 7, 31, 1940), die sich bei ihren Untersuchungen des gleichen Verfahrens der Abbildung mittels Elektronenstrahlen bedienen, bezeichnen neuerdings die von ihnen entsprechend früheren Untersuchungen von *G. Piekarski* u. *H. Ruska*, gefundenen Bakterienmembranen als Kapseln. Wir halten eine strenge Trennung dieser beiden morphologisch verschiedenen Gebilde für erforderlich.

Beobachtung entgehen mußte. Wir möchten sie mit dem früheren Begriff des Ektoplasmas nicht identifizieren. Besonders erwiesen erscheint ihre Existenz, wenn aus der Umhüllungsmembran der Inhalt ausgetreten ist (*Kruses* „Bakterienschatten", Abb. 29 u. 31), oder wenn sich sogar Falten in ihr nachweisen lassen (33, Abb. 13) (Abb. 32). Die Abb. 29 und 31 zeigen „Leermembranen", keine „Leerkapseln" (*Woloschin*). Reißt der die Bakterien tragende Kollodiumfilm bei der Beobachtung ein, und rollt er sich auf, so sieht man die aufgetrockneten Objekte von der Seite und erkennt, daß sie flach ausgebreitet auf der Unterlage haften.



Abb. 31. II 661/39
Streptococcus lanceolatus, „leere Bakterienmembran", 52stündige Kultur auf Blutagarplatte el. opt. 13000 : 1.

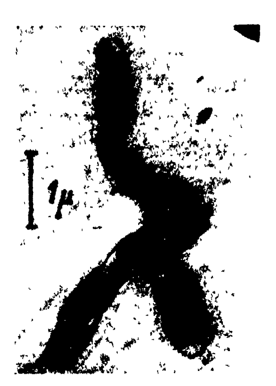


Abb. 32. II 469/39
Keim aus der Mundhöhle (unbestimmt) mit deutlicher Faltenbildung el. opt. 10000 : 1.

Außerhalb der Membran und damit außerhalb der Bakterien liegen häufig körnige Elemente, sogenannte Begleitkörperchen, der Zelle an (Abb. 30). Sie sind für einzelne Bakterienarten so charakteristisch, daß sie als spezifische Zellprodukte betrachtet werden müssen. Schleim erscheint meist als strukturloser Schleier um die Bakterienzelle und läßt sich nach Versuchen, die wir mit *Coli*-Bazillen ausgeführt haben, leicht durch Waschen entfernen. In ähnlicher Weise umgeben auch die Kapselsubstanzen den Bakterienkörper, und zwar teils als krümelig, körnige Substanz und teils als Auflagerung mit deutlich radiärer Struktur. Wir haben danach in der Kapselbildung lediglich Sonderfälle des allgemein verbreiteten Vorganges der Ausscheidung unlöslicher Substanzen vor uns. Es handelt sich bei ihr nicht um Quellung (*Binaghi*, *Gotschlich* u. a.) der äußeren Zellschicht, diese liegt vielmehr völlig intakt unter der Kapsel vor (Abb. 21). Nach außen ist die Kapselbegrenzung dagegen unscharf und ohne Membran (*Hinterberger*, *Hamm*). Die Kapselbefunde mancher Autoren an *Staphylokokken*, *Streptokokken*, *Typhus-*, *Pest-*, *Coli-* und *Proteus-Bazillen* dürften, sofern es sich nicht um Kunstprodukte durch die zum Teil sehr eingreifenden Darstellungsmaßnahmen handelt, ebenfalls bakterielle Abscheidungen sein. Der

wesentliche Unterschied zwischen Schleim und Kapsel ist der Umstand, daß die Schleimsubstanzen zwischen den Bakteriengruppen zusammenfließen (Abb. 9, 10, 11), während echte Kapseln (Abb. 18 bis 21) die einzelnen Bakterien oder Diplokokken isoliert umgeben.

Wie weitgehend die lichtoptischen Untersuchungen zur Frage der Außenbegrenzung der Bakterien zu Trugschlüssen führen können, zeigte schon das Beispiel der Tuberkulose (24). Ähnlich scheinen die Verhältnisse beim Milzbrand zu liegen. Wie sich beim *Tuberkelbazillus* keine dicke, wachsartige Hülle nachweisen ließ, so beim Milzbrand keine echte Kapsel. Auch in lichtoptischen Untersuchungen an ungewaschenen Milzbrandbazillen konnten wir uns wie *A. Fischer* (13) und *W. Enderle* (12) von der Existenz einer Kapsel nicht überzeugen. Es wäre dagegen unrichtig, mit *A. Fischer* auch das Vorhandensein einer Kapsel bei *Pneumobazillen* zu bestreiten. Im ungefärbten Präparat kann lichtoptisch der Eindruck einer Kapsel bei echter Kapselbildung entstehen, aber auch wenn sich Lücken im Ausstrichmaterial um die Bakterienzelle bilden. Dabei ist zu beachten, daß solche Lücken sowohl zwischen der Bakterienmembran und der Umgebung als auch innerhalb der Membran (Milzbrand) zwischen dieser und dem Cytoplasma vorkommen können. Die unmittelbare Abbildung der durchstrahlten Masse durch das übermikroskopische Verfahren schließt Täuschungen über das Vorhandensein oder Fehlen einer Kapselsubstanz aus.

Für die Überlassung von Bakterienstämmen sind wir dem bakteriologischen Laboratorium des Rudolf Virchow-Krankenhauses (Prof. Dr. *T. Wohlfeil*) und dem Hygienischen Institut der Universität Berlin (Dr. *A. Vierthaler*) zu großem Dank verpflichtet.

Zusammenfassung.

Die bisherigen Beobachtungen über die allgemeine Morphologie der Bakterien werden mit dem Siemens-Übermikroskop nach *E. Ruska* und *B. v. Borries* an kapselbildenden Bakterien erweitert.

Der Einfluß des Untersuchungsverfahrens auf Struktur und Lebensfähigkeit der Bakterien wird geprüft.

Die Deutung der gewonnenen Bilder erfolgt unter besonderer Berücksichtigung der Frage nach der Existenz und Struktur von Bakterienmembran und Kapsel.

An *Pneumokokken* läßt sich Membran und Kapsel oder Schleimsubstanz getrennt darstellen.

Die *Pneumobazillen* zeigen in parasitierendem Zustand außer Membran und Kapsel deutliche Inhaltkörper, die als Nucleoide angesprochen werden. Die Kapseln zeigen eine radiäre Ordnung ihres

Aufbaues. In der Kultur gewachsene *Pneumobazillen* zeigen keine Nucleoide.

Bei den *Milzbrandbazillen* ist die Membran in besonders schöner Ausbildung nachweisbar. Nach der Sporenreifung tritt die Spore durch eine polare Lücke in der Membran aus der Zelle aus. Kapseln sind bei *Milzbrandbazillen* nicht nachzuweisen gewesen.

Die Kapsel erscheint als Ausscheidungsprodukt des Bakteriums. Sie ist keine Aufquellung der äußeren Bakterienschicht. Diese läßt sich vielmehr völlig intakt unter der Kapsel nachweisen.

Literatur.

1) *Babes, V.*, Zeitschr. f. Hyg. **9**, 323, 1890; **20**, 420, 1895. — 2) *Derselbe*, C. r. Scc. Biol. Paris **68**, 315, 1910. — 3) *Bail, O.*, Handb. d. mikrobiol. Techn. II, S. 1152, 1923. Verlag Urban-Schwarzenberg. — 4) *Baumgärtel, T.* Grundr. d. theor. Bakteriologie, S. 9. Berlin, Jul. Springer, 1924. — 5) *Bergel, S.*, Beitr. z. Klin. der Tuberkul. **38**, 95, 1917. — 6) *Binaghi, R.*, Centralbl. f. Bakt. II, **4**, 897, 1898. — 7) *v. Borries, B.*, *E.* u. *H. Ruska*, Klin. Wochenschr. **17**, 921, 1938. — 8) *v. Borries, B.*, u. *E. Ruska*, Naturwiss. **27**, 281, 1939. — 9) *Dieselben*, ebenda, S. 577; Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie **56**, 317, 1939. — 10) *Bunge, R.*, Fortschr. d. Med. **12**, 462, 1894.

11) *Emmerich, R.*, u. Dr. *Saida*, Centralbl. f. Bakt. I, **27**, 776, 1900. — 12) *Enderle, W.*, Hat der Milzbrand eine Kapsel? Inaug.-Diss. Tübingen 1911. Leipzig, Verlag Hirzel.

13) *Fischer, A.*, Vorlesungen über Bakterien. Jena, Verlag G. Fischer, 1903. — 14) *Fürst, Th.*, Centralbl. f. Bakt. I, **56**, 97, 1910.

15) *Gotschlich, E.*, Handb. d. path. Mikroorgan. **1**, 75, 1929. — 16) *Gutstein, M.*, Centralbl. f. Bakt. I, **93**, 233, 1924.

17) *Hamm, A.*, Centralbl. f. Bakt. I, **43**, 287, 1907; **46**, 1, 1908. — 18) *Heim, L.*, Arb. a. d. Kaiserl. Ges.-Amt **5**, 520. — 19) *Derselbe*, Arch. f. Hyg. **40**, 55, 1901; Münch. med. Wochenschr. Nr. 10, 1904. — 20) *Hinterberger, A.*, Centralbl. f. Bakt. I, **30**, 424, 1901; **45**, 108, 1908.

21) *Johne*, Deutsch. Zeitschr. f. Tiermed. **19**, 244, 1894.

22) *Knoll, W.*, Beitr. z. Klin. d. Tuberkul. **15**, 211, 1910. — 23) *Kruse, W.*, in *Flügge*, Mikroorganismen **1**, 70, 1896.

24) *Lembke, A.*, *H. Ruska* u. *J. Christophersen*, Klin. Wochenschr. **19**, 217, 1940.

25) *Meyer, A.*, zitiert nach *Heim*, Lehrbuch der Bakteriologie, S. 198, 1922. — 26) *Migula, W.*, Deutsch. tierärztl. Wochenschr. 1896, S. 28, System d. Bakterien, S. 125. Jena, G. Fischer, 1900. — 27) *Müller, R.*, Medizinische Mikrobiologie. Verlag Lehmann, 1939.

28) *Nakanishi, K.*, Münch. med. Wochenschr. 1900, S. 187. — 29) *Noetzel, W.*, Fortschr. d. Med. **14**, 41, 1896.

30) *Ottolenghi, D.*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **9**, 769, 1911.

31) *Pane, N.*, Centralbl. f. Bakt. I, **58**, 570, 1911. — 32) *Piekarski, G.* u. *H. Ruska*, Klin. Wochenschr. **18**, 383, 1939. — 33) *Dieselben*, diese Zeitschr. **10**, 302, 1939. — 34) *Pietschmann, K.*, u. *A. Rippel*, ebenda **3**, 422, 1932.

35) *Ruska, H.*, Naturwiss. **27**, 287, 1939. — 36) *Derselbe*, ebenda **28**, 45, 1940. — 37) *Ruska, H.*, u. *E. Frühbrodt*, Der Biologe **9**, 69, 1940. — 38) *Ruska, H.*, Verhandl. d. Dtsch. Zoolog. Gesellschaft **1939**, S. 295.

39) *Sauerbeck, E.*, Centralbl. f. Bakt. I, **50**, 572, 1909; Zeitschr. f. Hyg. **56**, Nr. 9, 1909. — 40) *Schaudinn, F.*, Arch. f. Protistenkunde **1**, 314, 1902; **2**, 416, 1903.

41) *Töniessen, E.*, Centralbl. f. Bakt. I, **65**, 23, 1911.

42) *Unna, P. G.*, ebenda **3**, 97, 1888.

43) *Wohlfeil, T.*, in *C. Flügges* Grundriß der Hygiene, S. 586, 11. Aufl., 1940. — 44) *Woloschin, A. D.*, Centralbl. f. Bakt. I, **72**, 312, 1914.

45) *Zettnow, E.*, Zeitschr. f. Hyg. **24**, 74, 1897. — 46) *Derselbe*, ebenda **21**, 165, 1896; **86**, 25, 1915.

(Aus der Mikrobiologisch-Chemischen Abteilung der Biologischen Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem.)

Über die Bedeutung des Molybdäns für stickstoffbindende Nostocaceen.

Von

H. Bortels.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 21. März 1940.)

Wenn es im Erdboden und im Wasser Algen gibt, die nicht nur kohlenstoffautotroph, sondern außerdem stickstoffautotroph leben, dann müssen diese als die ersten und wichtigsten Bildner organischer Substanz auf der Erde angesprochen werden. Denn die höheren grünen Pflanzen assimilieren zwar die Kohlensäure der Luft, sind aber auf gebundenen Stickstoff angewiesen, während umgekehrt die stickstoffbindenden Bakterien zwar den elementaren Stickstoff der Luft assimilieren können, dafür aber mit organisch gebundenem Kohlenstoff versorgt werden müssen. Nur stickstoffbindende und zugleich kohlenstoffautotrophe Organismen würden imstande sein, in rein mineralischem Substrat, das zunächst auch keinen Stickstoff in gebundener Form enthält, zu wachsen, sich zu vermehren, somit organische Materie zu bilden und gewissermaßen als Pioniere des Lebens den Boden für alle folgenden Organismen vorzubereiten.

Im weiteren Sinne könnten auch gewisse Mikrobengemeinschaften[1] hierher gerechnet werden, in erster Linie Algen, die in Symbiose mit stickstoffbindenden Bakterien zu leben vermögen. So entnahmen *Wilfarth* und *Wimmer* (30) ihren Versuchsergebnissen, daß Algen entweder allein oder in Gemeinschaft mit Bakterien Stickstoff binden und auf diese Weise zur Humusbildung und zur Erhaltung der sogenannten alten Kraft des Bodens beitragen. Über eine fördernde Beeinflussung des stickstoffbindenden *Azotobacter chroococcum* durch Algen hat *Werner* (28) berichtet, und *Schröder* (24) konnte *Chlorella* gemeinsam mit *Azotobacter* in stickstofffreier mineralischer Nährlösung zur Entwicklung bringen. Assimilation des elementaren Stickstoffs durch *Azotobacter* in Symbiose mit *Oscillatoria* und *Gloeocapsa* hat *Menchikovsky* (18) festgestellt.

Diese Lebensgemeinschaften werden jedoch kaum in dem Maße erste Pionierdienste geleistet haben wie solche Mikroorganismen, die

[1] Von der Symbiose hoch entwickelter Pflanzen wie der Leguminosen mit stickstoffbindenden Bakterien kann in diesem Zusammenhange nicht gesprochen werden.

allein Kohlenstoff wie Stickstoff aus der Luft entnehmen können. Algen mit dieser Eigenschaft sollen sich nach Ansicht vieler, auch älterer Autoren unter den *Cyanophyceen* befinden. *Beijerinck* (4) hat deshalb geäußert, daß solche *Cyanophyceen* die Urbewohner der Erde seien. Denn sie leben „beinahe gänzlich" ohne gebundenen Stickstoff und siedeln sich als erste auf völlig sterilem Sand und auf vulkanischer Asche an (27).

Beijerinck war so vorsichtig, die untersuchten blaugrünen Algen als „oligonitrophil" zu bezeichnen. Eine geringe Menge gebundenen Stickstoffs hielt er für unentbehrlich, obwohl Stickstoff gebunden würde. Der Streit darüber, ob diese Algen tatsächlich in der Lage sind, mit Luft als einziger Stickstoffquelle auszukommen, ist seit der Entdeckung von *Frank* (9), der als erster Stickstoffbindung bei Algen nachgewiesen hat, bis in die neuere Zeit niemals endgültig entschieden worden. Während es noch in keinem Falle gelungen ist, *Grünalgen* in Abwesenheit stickstoffbindender Bakterien in stickstofffreier Nährlösung zu züchten, geht aus den Arbeiten jener Jahre [siehe *Drewes* (7)] hervor, daß zwar bakterienhaltige *Nostocaceen*-Kulturen Stickstoff binden können, daß aber bezeichnenderweise unter den Begleitbakterien dieser Algen häufig, wenn auch nicht immer, *Azotobacter* nachgewiesen worden ist. Die Feststellungen bezüglich einer stickstoffautotrophen Lebensweise blaugrüner Algen in absoluter Reinkultur oder wenigstens frei von stickstoffbindenden Bakterien lauteten widersprechend. Z. B. konnte *Glade* (12) im Gegensatz zu den übereinstimmenden Feststellungen von *Beijerinck* (4) und *Heinze* (14), die beide *Nostocaceen* zur Assimilation des Luftstickstoffs für befähigt hielten, bei Arten der Gattung *Cylindrospermum* keine Spur von Stickstoffbindung nachweisen. Ebenso glaubte *Esmarch* (8), daß *Nostocaceen* nur durch Vermittlung von *Azotobacter* den Luftstickstoff ausnutzen könnten. *Drewes* (7) hat schließlich die Frage endgültig zu entscheiden versucht, indem er nach der Methode von *Beijerinck* (4) in stickstofffreier mineralischer Nährlösung Erdalgen anreicherte, diese dann rein züchtete und untersuchte. Es waren wieder nur *Nostocaceen*, mit denen in 50 bis 60 Tagen Stickstoffgewinne bis zu etwa 3 mg in 250 ccm Nährlösung erzielt wurden. Das ist jedoch so wenig, daß die stickstoffbindende Eigenschaft dieser Algen auch weiterhin angezweifelt werden konnte [*Gistl* (11)].

Allison und Mitarbeiter (1, 2, 3) haben nun in ausgedehnten Untersuchungen einen deutlicheren Beweis dafür geliefert, daß Reinkulturen von *Nostocaceen* tatsächlich den Luftstickstoff zu assimilieren vermögen. Die Reinzucht der Algen gelang ihnen in sehr einfacher Weise durch Bestrahlung artreiner Kulturen mit ultraviolettem Licht, wodurch die Bakterien bei geeigneter Dosierung abgetötet, die Algen dagegen nicht geschädigt wurden. Die amerikanischen Autoren haben auch die von *Beijerinck* (4) schon getroffene Feststellung bestätigt, daß weder Grünalgen noch die ebenfalls sehr häufigen blaugrünen *Oscillatoria*-Arten die Fähigkeit zur Stickstoffbindung besitzen. Stets konnte diese Eigenschaft nur bei den *Nostocaceen* nachgewiesen werden. *Allison* und Mitarbeitern (1, 2, 3) ist dieser Nachweis durch Zugabe von Erdextrakt zur Nährlösung besonders deutlich gelungen. Durch diese Maßnahme erhöhte sich nämlich der Stickstoffgewinn in einem Zeitraum von 60 Tagen auf etwa 12 mg.

Allerdings kann nun wieder eingewendet werden, daß dem Nährmedium mit dem Erdextrakt auch Stickstoff zugeführt und damit nu

Beijerincks Anschauung von der Oligonitrophilie dieser Algen bestätigt wurde. Die amerikanischen Autoren erklären aber den auffallend fördernden Einfluß des Erdhumus mit dessen Gehalt an Eisen.

Erdhumus enthält jedoch außer Eisen noch andere wirksame Spurenelemente, von denen für stickstoffbindende Mikroorganismen vor allem das Molybdän in Frage kommt. Es schien deshalb geboten, Untersuchungen darüber anzustellen, ob auch *Nostocaceen* wie andere Stickstoffixierer durch Molybdän in ihrer Entwicklung gefördert werden, ob also auch bei diesen Organismen der Erdextrakt durch Molybdän ersetzt werden kann. Bejahendenfalls würde die allgemeine Bedeutung des Molybdäns für die biologische Stickstoffbindung und damit für die Fruchtbarkeit der Böden und Gewässer erneut unterstrichen. Denn *Nostocaceen* sind im Boden wie im Wasser weit verbreitet. Während ihre Beziehung zur Fruchtbarkeit des Bodens noch kaum untersucht worden ist — *Esmarch* (8) fand die Verbreitung der *Cyanophyceen* abhängig von Feuchtigkeit und Nährstoffmenge, *Gistl* (11) untersuchte den Einfluß der Anionen und *v. Schelhorn* (23) denjenigen der Reaktion —, gilt z. B. die Gattung *Aphanizomenon* geradezu als Leitform für besonders fruchtbare Fischteiche (32). Eine Bejahung der aufgeworfenen Frage würde ferner bedeuten, daß die *Nostocaceen* tatsächlich genau so wie etwa *Azotobacter* imstande sind, mit dem elementaren Stickstoff der Luft als einziger Stickstoffquelle zu leben, und daß nur deshalb die Stickstoffbindung teilweise nicht festgestellt werden konnte, weil den verwendeten Nährmedien Molybdän fehlte. Gleichzeitig mußte es sich erweisen, ob im Boden noch andere Algen außer den *Nostocaceen* bei Gegenwart von Molybdän stickstoffautotroph leben können. Eine besondere Anregung zur Untersuchung dieser Fragen lag in den Analysen von *Ter Meulen* (25, 26), die einen auffallend hohen Molybdängehalt anabaenahaltiger *Azolla*-Pflanzen aufwiesen und die dadurch schon andeuteten, daß Molybdän für diese Algen die gleiche Bedeutung haben könnte wie für stickstoffbindende Bakterien.

I. Nostocaceen aus Teichwasser.

Die Versuche, deren wesentlichste Ergebnisse schon 1938 in einem Vortrage (5) auszugsweise mitgeteilt werden konnten, erstreckten sich zunächst auf das Verhalten einiger aus einem Wasserbecken des Botanischen Gartens in Berlin-Dahlem gezüchteten *Nostoc*- und *Anabaena*-Arten. Diese Kulturen waren zwar artrein, aber nicht bakterienfrei und dienten nur zu einer ersten Orientierung. Sie wurden ebenso wie die später aus Erde gezüchteten und teilweise in absoluter Reinkultur untersuchten Formen in folgender Grundnährlösung kultiviert:

H_2O 1000; $FeSO_4 \cdot 7\,H_2O$ 0,1; $CaCO_3$ 0,5; $CaHPO_4 \cdot 2\,H_2O$ 0,5; K_2SO_4 0,5; $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ 0,3; NaCl 0,05; $MnSO_4 \cdot 7\,H_2O$ 0,005.

Nach der Zugabe von Ferrosulfat und Calciumcarbonat zum Wasser wurde dieses bis zur vollständigen Fällung von braunem Eisenhydroxyd geschüttelt. Erst dann wurde die Nährlösung mit den übrigen Salzen vervollständigt. Die schon von *Maertens* (16) erwähnte Lebensnotwendigkeit des Calciums ist eine von jenen bemerkenswerten Eigenschaften, die in gleicher Weise sowohl die *Nostocaceen* als auch das stickstoffbindende Bakterium *Azotobacter* auszeichnen.

Als Kulturgefäße dienten für die Algen bei Verwendung flüssigen Nährmediums teils 100 ccm fassende Erlenmeyerkolben (für 20 ccm Nährlösung) aus Jenaer Geräteglas Nr. 20, teils Reagensröhrchen und bei Benutzung von Agarnährböden Petrischalen. Die später zu erwähnende *Azolla* wurde in der gleichen Nährlösung, aber meistens in Erlenmeyerkolben von 300 ccm Inhalt, seltener in solchen von 100 oder 750 ccm Inhalt oder anderen Gefäßen aus demselben Jenaer Glas in entsprechenden Nährlösungsmengen kultiviert.

Immer standen die Kulturen im Gewächshaus im diffusen Tageslicht, das in den Wintermonaten[1] nachts durch künstliche Beleuchtung ergänzt wurde, bei Temperaturen von 22 bis 28° C.

Die Stickstoffanalysen wurden nach *Kjeldahl* und im Falle, daß die Nährlösungen Nitrat enthielten, nach *Förster* ausgeführt, in beiden Fällen unter Verwendung von *Wieninger*s Reaktionsgemisch. Jedoch wurde das Ammoniak in borsäurehaltiges Wasser überdestilliert und mit $^1/_{50}$ n Schwefelsäure titriert.

In erster Linie sollten Molybdän und Vanadium in ihrer Wirkung auf *Anabaena* und *Nostoc* geprüft und mit Erdextraktasche verglichen werden, die durch Veraschen eines wässerigen Auszuges von Mistbeeterde gewonnen worden war. Da nach Verimpfung der Algen in für stickstoffbindende Bakterien geeignete stickstofffreie Nährmedien im Dunkeln bei 29° C keine Bakterienentwicklung festgestellt werden konnte, die Kulturen also offenbar keine stickstoffbindenden Bakterien enthielten, wurde außerdem versucht, das Algenwachstum durch zusätzliche Beimpfung mit drei verschiedenen Stämmen von *Azotobacter chroococcum* und einem von *Azotobacter vinelandii* zu fördern. In einer weiteren Versuchsreihe kamen *Anabaena* und *Nostoc* in Mischkulturen zur Untersuchung. Diese wurden nach etwa 4 Wochen der Stickstoffanalyse unterworfen, die beiden anderen Reihen mit *Nostoc* und *Anabaena* in artreiner Kultur 12 Tage später. In den Tabellen I und II sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Tabelle I. Wirkung verschiedener Zusätze auf eine bakterienhaltige Mischkultur von *Anabaena spec.* + *Nostoc spec.* 4. März bis 1. April 1937.

Grundnährlösung	mg N in 100 ccm
Ohne Zusatz	2,0
+ 0,00001 % $NaVO_3 \cdot 4 H_2O$	4,1
+ 0,0001 % $Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$	5,5
+ Erdextraktasche	5,5
+ 0,0001 % $Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$ + *Azotobacter*	5,1

[1] Mit Ausnahme der Wintermonate 1939/40.

Tabelle II. Wirkung verschiedener Zusätze auf bakterienhaltige, artreine Kulturen von *Anabaena spec.* bzw. *Nostoc spec.*

4. März bis 13. April 1937.

Grundnährlösung	mg N in 100 ccm	
	Anabaena spec.	*Nostoc spec.*
Ohne Zusatz	3,4	2,0
+ 0,00001 % $NaVO_3 \cdot 4\,H_2O$	4,6	4,0
+ 0,0001 % $Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$	6,9	5,2
+ Erdextraktasche	7,5	5,6
+ 0,0001 % $Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$ + *Azotobacter*	7,0	5,6

Schon aus diesen Ergebnissen der ersten einleitenden Versuche konnte geschlossen werden, daß mit nicht stickstoffbindenden Bakterien verunreinigte *Nostoc*- und *Anabaena*-Arten tatsächlich Stickstoff binden und in dieser Eigenschaft durch die Gegenwart verschiedener *Azotobacter*-Arten nicht einmal eine Unterstützung erfahren, wohl aber in gleicher Weise wie diese Bakterien durch Molybdän und andere Wirkstoffe. Von diesen letzteren dürfte in Erdextraktasche nichts vorliegen, was die Stickstoffbindung der Algen wie die der Bakterien stärker fördert als Molybdän.

Weitere Versuche mit den beiden aus Teichwasser isolierten *Nostocaceen*-Kulturen haben diese Erkenntnisse immer wieder bestätigt. Nachdem die Algen erst einige Male in molybdänfreie Nährlösung übergeimpft und auf diese Weise selbst wahrscheinlich molybdänärmer geworden waren, trat die fördernde Wirkung des Molybdäns noch deutlicher in Erscheinung (Tabelle III und IV). Auch ließ sich bei Berücksichtigung der langsameren Entwicklung der Algen im Vergleich mit derjenigen der Bakterien nach einer entsprechend langen Kultivierungszeit ein Stickstoffgewinn erzielen, der dem bei *Azotobacter* erreichten schon nahe kommt. Die Stickstoffbindung der *Nostocaceen* ist also unter künstlichen Bedingungen bei Gegenwart von Molybdän ganz beachtlich und wird unter den natürlichen Verhältnissen des Bodens und Wassers vielleicht noch größer sein.

Tabelle III. Wirkung von Vanadium, Molybdän und Erdextraktasche auf bakterienhaltige, artreine Kulturen von *Anabaena spec.* bzw. *Nostoc spec.*

3. April bis 3. Mai 1937.

Grundnährlösung	mg N in 100 ccm			
	Anabaena spec.		*Nostoc spec.*	
Ohne Zusatz	2,0	2,4	1,4	1,5
+ 0,00001 % $NaVO_3 \cdot 4\,H_2O$	4,5	4,5	2,9	2,9
+ 0,0001 % $Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$	8,1	8,5	5,7	6,4
+ Erdextraktasche	7,8	7,3	5,9	5,9

Tabelle IV. Wirkung des Molybdäns auf eine bakterienhaltige, artreine Kultur von *Anabaena spec.*
7. Mai bis 21. Juli 1937.

Grundnährlösung	mg N in 100 ccm	
Ohne Zusatz	4,0	5,5
+ 0,0001 % $Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$	21,0	21,5

Schon rein äußerlich lassen sich in Abb. 1 die molybdänfreien Kulturen des Versuchs der Tabelle IV als kümmerlich entwickelte, chlorotische Stickstoff-Hungerkulturen von den dunkel blaugrün gefärbten, kräftig entwickelten molybdänhaltigen Kulturen unterscheiden.

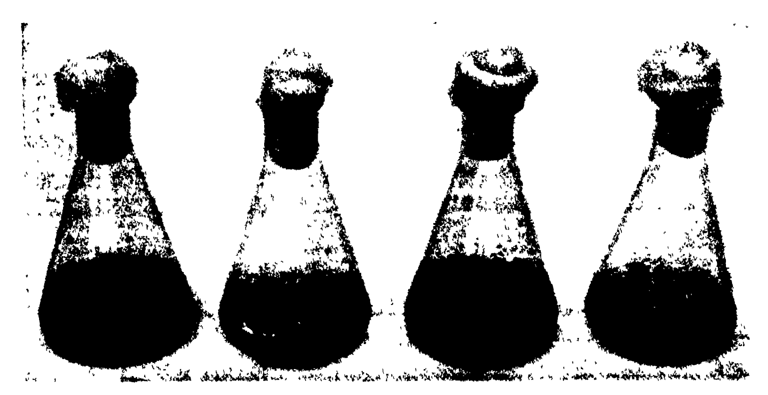


Abb. 1. Fördernder Einfluß des Molybdäns auf die Entwicklung von *Anabaena spec.* in stickstofffreier Nährlösung. 7. Mai bis 21. Juli 1937.

Der Versuch, eine *Aphanizomenon*-Art aus dem Wasser eines Fischteiches in Kultur zu nehmen, scheiterte. In der angegebenen synthetischen Nährlösung fand weder mit noch ohne Zugabe von Molybdat oder Nitrat Vermehrung statt. Die Alge scheint besondere Ansprüche zu stellen, die noch nicht bekannt sind[1].

II. Nostocaceen aus Ackerböden.

Nach diesen einleitenden Versuchen mit aus Wasser gezüchteten Algen wurde die eigentliche Aufgabe der Isolierung und Untersuchung bodenbewohnender stickstoffbindender Algen begonnen. Dazu standen sechs verschiedene Ackerböden[2] zur Verfügung, die durch die Angaben in Tabelle V kurz charakterisiert sind.

[1] Darauf wurde ich schon von Herrn Prof. Dr. *Wunder*, Breslau, aufmerksam gemacht, dem ich hierfür sowie für freundliche Zusendung des sichelalgenhaltigen Teichwassers bestens danken möchte.

[2] Den Einsendern der von außerhalb Berlins bezogenen Böden spreche ich auch an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank aus.

Tabelle V. Beschreibung der Versuchsböden.

Bezeichnung	Herkunft	p_H	mg N in 5 g Erde		Physikalische Beschaffenheit	Fruchtbarkeit
St	Stade	6,1	3,3	3,5	schwach anmooriger Geestsand	sehr gering
D	Berlin-Dahlem	7,0	2,4	2,7	humusarmer sandiger Lehm	mittelmäßig
Gö	Göttingen	7,6	6,9	7,0	humusarmer Lehm	groß
R	Rosdorf bei Göttingen	7,2	8,6	9,0	humusreicher Lehm	groß
O	Gr. Ottersleben am Harz	7,5	9,9	10,6	humusreicher Lehm (Schwarzerde)	sehr groß
Gu	Guhrau i. Schlesien	8,0	7,2	7,3	humusreicher sandiger Lehm (Schwarzerde)	sehr groß

Diese Böden wurden volumenmäßig mit sterilem Leitungswasser im Verhältnis 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10000, 1 : 100000 und 1 : 1000000 verdünnt, und zwar kamen zunächst 12 ccm auf 1 mm gesiebter und in das Meßgefäß fest eingepreßter, naturfeuchter Erde mit einem Wassergehalt von etwa 50 % des Fassungsvermögens in 1188 ccm steriles Leitungswasser. Nach längerem, kräftigem Schütteln wurden hiervon 10 ccm in 90 ccm steriles Leitungswasser übertragen usf. bis zur Verdünnung von 1 : 1000000. Von jeder dieser 5 Verdünnungen wurde dann jeweils in fünffacher Wiederholung 1 ccm in mit Wattestopfen verschlossene Reagensröhrchen mit 5 ccm Nährlösung verimpft. Da aus den Böden nicht nur molybdänbedürftige, stickstoffbindende, sondern zum Vergleich auch andere, *grüne* und *blaugrüne Algen* sowie *Diatomeen* angereichert werden sollten, waren der Grundnährlösung außer 0,0005 % Natriummolybdat noch 0,05 % Kieselsäurehydrat und zur Hälfte auch 0,1 % Calciumnitrat zugesetzt worden. Die so beimpften Röhrchen lagen vom 7. Oktober bis 1. November 1937 im Gewächshaus auf einem Lattengerüst in schräger Stellung, so daß die Nährlösung eine größere Oberfläche bildete und besser durchlüftet wurde. Algenkulturen in Reagensröhrchen wurden stets in dieser schrägen Lage angezogen.

Am 1. November 1937 waren die Nährlösungen mehr oder weniger stark mit Algen bewachsen und wurden deshalb zunächst makroskopisch miteinander verglichen. Der Befund ist in Abb. 2 niedergelegt.

Auf der Ordinate sind die Verdünnungen I, II, III, IV entsprechend 1 : 100 bis 1 : 100000 und für jede Verdünnung außerdem die 5 Röhrchen aufgetragen. Auf der Abszisse finden sich die Böden hintereinander gereiht. Die Säulen geben dann ungefähr die quantitative Verteilung der 4 Algengruppen wieder. Die Angaben über *Diatomeen* sind allerdings sehr ungenau, da diese sicher häufig von *Grünalgen* und *Blaualgen* überwuchert und darum nicht zu erkennen waren.

Da Zahl und Art der Algen eines Bodens noch von vielen anderen Faktoren abhängig sind, wie z. B. die Untersuchungen von *Esmarch* (8),

v. Schelhorn (23) und *Gistl* (11) lehren, ist es nicht verwunderlich, daß in Abb. 2 keine klare Beziehung zwischen der Fruchtbarkeit eines Bodens und seiner Algenflora zum Ausdruck kommt. Immerhin haben sich zwei Tatsachen ganz deutlich herausgestellt: In dem unfruchtbarsten der sechs untersuchten Böden wurden keine *Nostocaceen* aufgefunden, und diese sind aus den anderen Böden nur in der stickstofffreien Nährlösung angewachsen, jedenfalls bei Beginn der Versuchszeit. Es ist also

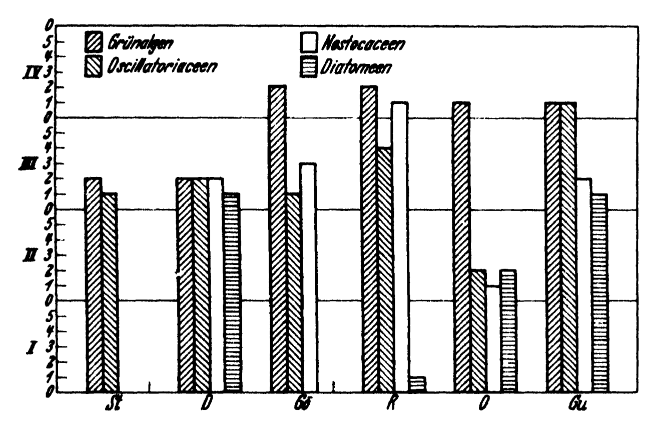


Abb. 2. Gehalt der Versuchsböden an verschiedenen Algengruppen.

wohl hieraus zu schließen, daß diese *Nostocaceen* irgendwie den Luftstickstoff auszunutzen imstande sind und ähnlich wie *Azotobacter* in fruchtbareren Böden zahlreicher vorkommen als in weniger fruchtbaren. Die ebenfalls blaugrünen *Oscillatoriaceen* wurden dagegen nur in der stickstoffhaltigen Nährlösung angetroffen. Sie sind ebenso wie die *Grünalgen* nach Überimpfung in stickstofffreie Nährlösung nicht angewachsen, sondern nur in stickstoffhaltiger Nährlösung. Damit findet eine Beobachtung ihre Bestätigung, die u. a. schon *Beijerinck* (4) angestellt hat, der in stickstofffreier Nährlösung auch nur *Nostocaceen* anreichern konnte.

Da also die bodenbewohnenden *Nostocaceen* auf Grund aller bisherigen Beobachtungen höchstwahrscheinlich selbst Stickstoff binden und sich demzufolge ähnlich verhalten wie *Azotobacter*, mußte ein Vergleich des *Nostocaceen*-Gehalts mit dem *Azotobacter*-Gehalt der verschiedenen Böden besonders aufschlußreich sein.

Die *Azotobacter*-Zahl wurde nach der *Winogradsky*schen Erdplattenmethode ermittelt. Zu einer Mischung von 30 g auf 1 mm gesiebter und sterilisierter Felderde, 1,5 g löslicher Stärke und 0,3 g Calciumcarbonat wurden 6,5 ccm Flüssigkeit gegeben, bestehend aus 1 ccm Bodenaufschwemmung und 5,5 ccm folgender Nährlösung: H_2O 100, K_2HPO_4 0,1,

$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ 0,05, $Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$ 0,023. Die Bodenaufschwemmung bestand aus 1 ccm der zu untersuchenden auf 1 mm gesiebten, naturfeuchten Erde (Wassergehalt etwa 50 % des Fassungsvermögens) und 100 ccm, im Falle der an *Azotobacter* verhältnismäßig armen Böden St und D 10 ccm Wasser. Das Ganze wurde dann nach gründlichem Durchkneten in Petrischalen eingedrückt, oberflächlich glattgestrichen und in feuchter Kammer bei 28° C aufbewahrt.

Tabelle VI. Azotobacter-Gehalt der Versuchsböden.
12. bis 16. November 1937.

Verdünnung:	1 : 10		1 : 100			
Boden:	St	D	Gö	R	O	Gu
Zahl der Kolonien auf einer Platte	0	15	3	1	1	25
	1	17	3	4	1	28
	1	18	3	7	2	37
	1	23	4	8	5	39
Summe:	3	73	13	20	9	129
Mittel:	0,8	18,3	3,3	5,0	2,3	32,3

Nach vier Tagen wurden die auf der Oberfläche der Platten gewachsenen *Azotobacter*-Kolonien gezählt. Aus dem in Tabelle VI aufgeführten Ergebnis ist eine gewisse Ähnlichkeit des *Azotobacter*-Gehalts mit dem *Nostocaceen*-Gehalt der verschiedenen Böden zu entnehmen. Vor allem enthält der magere Geestboden St nicht nur keine stickstoffbindenden Algen, sondern auch kaum *Azotobacter*, und der verhältnismäßig geringen Zahl von *Nostocaceen* wie auch anderer Algen in dem stickstoffreichsten Boden O entspricht auch eine verhältnismäßig kleine Azotobacter-Zahl. Bei weitem am meisten *Azotobacter* enthielt die Guhrauer Schwarzerde. Sie war aber auch am ausgiebigsten in der *Nostocaceen*-Anreicherung, was allerdings aus der ziemlich rohen und nur summarisch quantitativen Betrachtungsweise der Abb. 2 nicht hervorgeht. Nachdem aber die Anreicherungskulturen mikroskopisch durchgemustert worden waren, zeigte es sich doch, daß der Boden Gu die artenreichste *Nostocaceen*-Flora enthielt (siehe Tabelle VII, S. 165).

Um artreine Kulturen zu erhalten, wurden mit der Platinöse kleine Mengen der an der Röhrchenwandung in stickstofffreier Nährlösung angewachsenen blaugrünen Kolonien auf 2 %igen Agar von der Zusammensetzung der Grundnährlösung mit 0,001 % Natriummolybdat in Petrischalen übertragen. Vom Rand der sich hieraus entwickelnden Kolonien wurde abermals eine kleine Menge auf frischen Agarnährboden übergeimpft. Dieses auch schon von anderen benutzte Verfahren führte nach mehrmaliger Wiederholung zu artreinen und bakterienarmen Kulturen, die, wieder in Nährlösung in Röhrchen übertragen und hier gut angewachsen, zur Gewinnung absoluter Reinkulturen Verwendung fanden.

Die vollständige Reinzüchtung gelang bei einem Teil der Algen nach dem Verfahren von *Allison* und Mitarbeitern (3) durch Bestrahlung mit

ultravioletten Licht in verhältnismäßig kurzer Zeit. Etwa eine Impföse voll des kräftig entwickelten Thallus einer Röhrchenkultur wurde nach Übertragung in etwa 2 ccm sterilen Leitungswassers im Quarzröhrchen und nach Zerkleinerung des Thallusstückchens durch kräftiges Schütteln der Bestrahlung ausgesetzt. Die Entfernung des fast horizontal liegenden Röhrchens vom Brenner einer Hanauer Analysenlampe betrug 20 cm, die Bestrahlungsdauer bei fortwährender kräftiger Ventilation und mehrfachem Umschütteln je nach Empfindlichkeit der Alge 8 bis 12 Minuten. Danach wurde möglichst wenig der bestrahlten Kultur in frische sterile Nährlösung übertragen. War die Abimpfung angewachsen, dann erfolgte die Untersuchung auf Reinheit, die nur bei einem Teil der Algenkulturen erreicht werden konnte. Zu den nicht völlig von Bakterien befreiten Kulturen zählten vor allem die in stark schleimigen Lagern wachsenden *Nostoc*-Arten. Vielleicht würde die Reinzucht nach mehrfacher Wiederholung der Bestrahlung auch bei diesen gelungen sein. Jedoch scheint das nicht erforderlich, da nicht angenommen werden konnte, daß sich diese Algen in Reinkultur hinsichtlich Stickstoffbindung und Molybdänbedürftigkeit anders verhalten würden. Im übrigen wurden in diesen Kulturen keine stickstoffbindenden Bakterien nachgewiesen, sondern *Bact. prodigiosum* und andere stickstoffheterotrophe Arten. Die Algen wurden als bakterienfrei angesehen, wenn sich in Bouillon nach kräftiger Beimpfung auch nach 1 bis 2 Wochen bei 26° C keine Bakterien entwickelten und im mit wässerigem Methylenblau gefärbten Ausstrich bei etwa 1300facher Vergrößerung mit Ölimmersion mikroskopisch keine Bakterien nachgewiesen werden konnten. In einigen dieser so rein gezüchteten Kulturen wurde später erneut bakterielle Spontaninfektion festgestellt.

Bei jeder Überimpfung, die etwa alle vier Wochen ausgeführt werden mußte, wurde jede Kultur sowohl in Nährlösung ohne Molybdänzusatz als auch in molybdänhaltige Nährlösung geimpft. Für Versuchszwecke kamen aber nur die jeweils jüngsten Kulturen in Nährlösung ohne Molybdänzusatz zur Verwendung, weil diese an Molybdän verarmte Algen enthielten, die bei Prüfung auf Molybdänbedürftigkeit deutlicher ansprachen.

Bei der mikroskopischen Untersuchung und systematischen Einordnung nach *Geitler* und *Pascher* (10) ergab sich zunächst die Tatsache, daß nur drei Gattungen der *Nostocaceen* vertreten waren, nämlich *Nostoc*, *Anabaena* und *Cylindrospermum*. Da auch *Beijerinck* (4) sowie *Allison* und Mitarbeiter (3), wie schon erwähnt wurde, nur Vertreter dieser drei Gattungen aus Erde anreichern konnten, ist es unwahrscheinlich, daß noch Arten anderer als der aufgeführten Gattungen als Stickstoffixierer im Boden tätig sind.

Die nähere Bestimmung gestaltete sich im übrigen sehr schwierig, worauf auch *Geitler* und *Pascher* (10) in ihrem Buch selbst hinweisen. In vielen Fällen war es schon nicht leicht zu entscheiden, ob es sich um eine *Nostoc*- oder *Anabaena*-Art handelte. Deshalb wurde durchgehend jede Form, deren Trichome nicht deutlich in eine mehr oder weniger dicke Schleimhülle eingebettet waren, oder die nicht in mikroskopisch oder makroskopisch schleimigen, sondern in häutigen Lagern wuchs, zur Gattung *Anabaena* gestellt. Wenn hier schon bei Bestimmung der

Gattungszugehörigkeit die Schwierigkeiten zuweilen groß waren, so erschienen sie fast unüberwindlich bei Bestimmung der Art. Obwohl keine der isolierten Formen mit einer der beschriebenen Arten in jeder Beziehung vollständig übereinstimmte, habe ich mich doch nicht entschließen können, sie mit neuen Namen zu belegen, abgesehen von der einen Kultur O 3. Vielmehr haben sie die Bezeichnung derjenigen bekannten Art erhalten, der sie am nächsten stehen. Man wird auch wohl nicht fehlgehen in der Annahme, daß es sich in den meisten Fällen tatsächlich nur um Varianten dieser bekannten Arten handelt.

Im Rahmen des untersuchten Problems war es außerdem nicht so wichtig, über die Artzugehörigkeit der isolierten Kulturen endgültig zu entscheiden. Es würde sich aber lohnen, an umfangreicherem Material aus verschiedenen Böden eine genaue Bestimmung der Arten vorzunehmen und Vergleiche anzustellen zwischen Fruchtbarkeit, Molybdängehalt, *Azotobacter*- und *Nostocaceen*-Zahl verschiedener Böden, um so die Standortverhältnisse dieser so wichtigen Mikroorganismen weiter zu klären. Immerhin hat sich bei der vergleichenden morphologischen Untersuchung der insgesamt 38 isolierten Kulturen schon gezeigt, wie aus Tabelle VII zu entnehmen ist, daß der an *Azotobacter* reichste, sehr

Tabelle VII.
Die aus den Versuchsböden isolierten *Nostocaceen*-Arten.

Boden	Nr. der Kultur	Wahrscheinliche Artzugehörigkeit der Kultur
St	—	—
D	1	*Nostoc calcicola Bréb.*
D	2—5	„ *punctiforme (Kütz) Hariot.*
D	6—7	*Anabaena variabilis Kütz.*
D	8	*Cylindrospermum maius Kütz.*
Gö	1	*Nostoc paludosum Kütz.*
Gö	2	„ *punctiforme (Kütz) Hariot.*
Gö	3	*Anabaena variabilis Kütz.*
Gö	4	*Cylindrospermum licheniforme (Bory) Kütz.*
R	1—2	*Nostoc punctiforme (Kütz) Hariot.*
R	3—4	*Anabaena variabilis Kütz.*
R	5	*Cylindrospermum maius Kütz.*
O	1—2	*Anabaena variabilis Kütz.*
O	3	„ *humicola nov. spec.*
O	4	*Cylindrospermum licheniforme (Bory) Kütz.*
Gu	1	*Nostoc muscorum Kütz.*
Gu	2—6	„ *punctiforme (Kütz) Hariot.*
Gu	7—12	*Anabaena variabilis Kütz.*
Gu	13	„ *cylindrica Lemm.*
Gu	14	„ *torulosa (Carm.) Lagerh.*
Gu	15	„ *oscillarioides Bory.*
Gu	16	„ *Hallensis (Jancz.) Born. et Flah.*
Gu	17	*Cylindrospermum maius Kütz.*

fruchtbare Boden Gu auch am meisten großzellige, typische *Anabaena*-Arten enthielt. Von allen *Nostocaceen* scheinen demnach diese in ihren Ernährungsansprüchen dem in vieler Beziehung nahe verwandten *Azotobacter* am ähnlichsten zu sein.

Möglicherweise werden noch einige andere Arten in den Kulturen angewachsen sein, die nicht untersucht und bestimmt wurden. Dadurch dürfte aber das Gesamtbild kaum eine wesentliche Veränderung erfahren haben. Auffallend ist, daß in allen Böden nur wenig typische, auch in der Nährlösung in einzelnen großen, schleimigen Lagern wachsende *Nostoc*-Arten, dafür aber um so mehr *Nostoc* oder *Anabaena* aus den Formenkreisen *Nostoc punctiforme* und *Anabaena variabilis* aufgefunden wurden. Die weitaus meisten Isolierungen aus allen Böden stellten solche Formen dar. Außer *Anabaena variabilis* konnten besonders typische, großzellige *Anabaena*-Arten nur in den beiden sehr fruchtbaren Schwarzerden nachgewiesen werden, und zwar eine Form, die in keiner Weise mit den bisher beschriebenen Arten vergleichbar zu sein schien aus dem Boden O und mehrere andere aus dem Boden Gu. *Geitler*s und *Pascher*s (10) Ansicht von der Artenarmut erdbewohnender Anabaenen — „auf feuchter Erde leben nur wenige (*A. variabilis*, *A. gelatinicola*)" — ist jedenfalls für besonders fruchtbare Schwarzerden in diesem Umfange nicht aufrechtzuerhalten.



Abb. 3. *Anabaena humicola nov. spec.* in molybdänhaltiger, stickstofffreier Grundnährlösung, lebend, ungefärbt. Vergr. 380 mal.

Für die neue, in Abb. 3 dargestellte *Anabaena*-Art wird folgende kurze Diagnose gegeben:

Trichome gerade, ohne sichtbare Schleimhülle, parallel in blaugrünen Strängen wachsend.

Vegetative Zellen, 4,5 μ dick, 2,5 bis 4,5 μ lang.

Heterocysten, 5,5 bis 6,5 μ dick, 5,5 bis 7,5 μ lang.

Dauerzellen nicht erkennbar.

Die Gattung *Cylindrospermum* ist offenbar mit einigen wenigen Arten in jedem einigermaßen fruchtbaren Boden vertreten.

Mit je einer nicht näher untersuchten und auch noch bakterienhaltigen *Nostoc*- und *Anabaena*-Art aus der Guhrauer Schwarzerde wurde der erste Stickstoffbindungsversuch durchgeführt. Es sollte vor allem geprüft werden, ob eine aus diesem sehr fruchtbaren und den stickstoffbindenden Bakterien und *Nostocaceen* offenbar auch sehr zusagenden Boden gewonnene Erdextraktasche das Molybdän in seiner fördernden Wirkung vielleicht noch übertreffen würde. Die Analysen-

werte der Tabelle VIII lehren das Gegenteil. Es gibt anscheinend keinen Aschenbestandteil der Erde, der in der benutzten synthetischen Nährlösung die Entwicklung und Stickstoffbindung der blaugrünen Algen aus den drei erwähnten Gattungen stärker begünstigen könnte als Molybdän.

Tabelle VIII. Wirkung von Erdextraktasche und Molybdän auf eine bakterienhaltige, artreine Kultur von *Anabaena spec.* bzw. *Nostoc spec.* aus Boden Gu.

2. September bis 9. Oktober 1937.

Grundnährlösung	mg N in 100 ccm			
	Anabaena spec.		*Nostoc spec.*	
Ohne Zusatz	2,8	3,5	2,8	3,5
+ Erdextraktasche Gu	3,8	3,9	3,9	4,1
+ 0.0001 % $Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$	9.0	9.7	8.5	9.2

Trotzdem wurde auch an den aus Erde isolierten Algen nochmals untersucht, ob nicht vielleicht Vanadium die Stickstoffbindung stärker fördert als Molybdän. An der mehr oder weniger dunklen Färbung der in Abb. 4 dargestellten drei Gattungen *Nostoc*, *Anabaena* und *Cylindrospermum* ist zu erkennen, daß ihre Entwicklung vor allem durch Molybdän gefördert worden ist. Vanadium ist teilweise sogar von schwach hemmendem Einfluß gewesen. Nur einige Kulturen, darunter D 1 (*N. calcicola*), Gö 1 (*N. paludosum*) und D 8 (*C. maius*), haben auch auf die Vanadiumgabe mit etwas stärkerer Entwicklung gegenüber der Kontrolle angesprochen.

Im übrigen ist aus der Abbildung kein Unterschied im Verhalten der bakterienhaltigen und der absolut reinen Kulturen zu ersehen. Damit ist zur Genüge bewiesen, daß die Begleitbakterien, deren Unfähigkeit zur Stickstoffbindung in zuckerhaltiger Nährlösung schon vor der Reinzüchtung der Algen nachgewiesen werden konnte, auch symbiontisch an der Stickstoffbindung der *Nostocaceen* nicht beteiligt sind.

Schon im Verlauf dieses Versuchs war eine geringere Entwicklungsfreudigkeit auch in den molybdänhaltigen Nährlösungen im Vergleich mit früheren Kulturen aufgefallen, und zwar verhielten sich hierin ebenfalls die bakterienfreien Kulturen nicht anders als die bakterienhaltigen. Deshalb wurde die Nährlösung abermals verschiedentlich abgeändert, um auf diese Weise vielleicht doch noch ein Nährmedium zu finden, das dem natürlichen Standort mehr entsprach. Zunächst wurde in Anlehnung an die mit *Azotobacter* gesammelten Erfahrungen (6) ein Zusatz von Wolframat, Silikat oder Agar zur Nährlösung in seiner Wirkung auf die Entwicklung der Algen geprüft. Agar, zusätzlich zu Molybdän gegeben, hatte die Stickstoffbindung von *Azotobacter* besonders

dann gefördert, wenn die Bakterien unter dem Einfluß ungünstiger Wetterverhältnisse standen. Solche Wettereinflüsse konnten auch bei den Algen vorliegen. Jedoch blieb den Versuchen, die sich von November 1938 bis Mai 1939 hinzogen, diesmal der Erfolg versagt. Schließlich wurden den Nährlösungen auch noch eine Spur Jodkalium und 10 % unveraschter Erdextrakt zugefügt. Aber auch das änderte nichts.

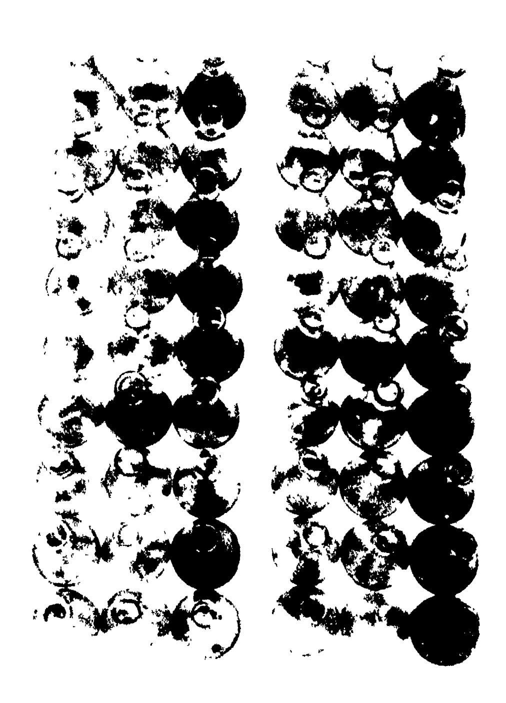


Abb. 4. Fördernder Einfluß des Molybdäns auf absolut reine und bakterienhaltige Kulturen der Gattungen *Nostoc*, *Anabaena* und *Cylindrospermum*.
Reihenfolge der Arten in zwei Säulen von oben nach unten:

Gu 10, rein (*A. variabilis*),	Gu 2, rein (*N. punctiforme*),
Gu 12 (*A. variabilis*),	R 2, rein (*N. punctiforme*),
O 3, rein (*A. humicola*),	Gu 16 (*A. Hallensis*),
O 2, rein (*A. variabilis*),	Gö 1, rein (*N. paludosum*),
D 2 (*N. punctiforme*),	D 8, rein (*C. maius*),
D 1 (*N. calcicola*),	Gu 6 (*N. punctiforme*),
D 6, rein (*A. variabilis*),	O 4, rein (*C. licheniforme*),
R 1 (*N. punctiforme*),	Gu 13, rein (*A. cylindrica*),
Gö 4, rein (*C. licheniforme*),	O 1, rein (*A. variabilis*).

Jeweils von links nach rechts: Ohne Zusatz, + V, + Mo. 7. Oktober bis 7. November 1938.

Etwas besser entwickelten sich die Algen wieder, nachdem die Kulturen nicht mehr wie bisher in Nährlösung ohne Molybdatzusatz fortgezüchtet wurden, sondern in diese Reihe Ende Mai 1939 Nährlösung mit 0,001 % Natriummolybdat eingeschaltet wurde. Schon die Ab-

impfungen hiervon in abermals molybdänhaltige Lösung wuchsen etwas kräftiger als entsprechende Kulturen, die aus molybdänfreier Lösung beimpft worden waren. Die ausschließliche Züchtung der Stammkulturen in molybdänhaltiger Nährlösung hatte allerdings den Nachteil, daß die für die Versuche benutzten Ausgangskulturen kein molybdänarmes Impfmaterial lieferten. Das ist an dem verhältnismäßig hohen Stickstoffgewinn in den Kontroll-Nährlösungen des folgenden Versuchs in Tabelle IX zu erkennen der die Frage beantworten sollte, ob unveraschter Erdextrakt, neben Molybdat verabreicht, die Stickstoffbindung etwa noch weiter fördern würde.

Tabelle IX. Wirkung von Molybdän und Erdextrakt auf *Nostocaceen*. 10. Juni bis 9. August 1939.

Grundnährlösung	mg N in 100 ccm							
	D 4 (*N. calcicola*)		Gu 10 (*A. variabilis*) rein		Gu 14 (*A. torulosa*) rein		D 8 (*C. maius*) rein	
Ohne Zusatz	10,9	12,0	8,3	8,5	10,5	9,9	8,3	9,0
+ 0,001 % $Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$	15,0	15,0	11,9	12,5	14,7	21,6*	9,9	12,0
+ 0,001 % $Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$ + Erdextrakt	15.7	16.2	13.6	14.1	13.7	14.8	10.4	10.8

* Der hohe Wert für die eine Kultur von *A. torulosa* in molybdänhaltiger Lösung bildet eine nicht erklärbare Ausnahme.

Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß der Erdextrakt selbst etwas Stickstoff enthält, muß aus den Analysen gefolgert werden, daß er die eindeutig fördernde Wirkung des Molybdäns nicht zu steigern vermag. Im ganzen gesehen, wurde auch in dieser verhältnismäßig langen Versuchszeit von 8 Wochen wenig Stickstoff gebunden[1]. Da außerdem die Kontrollkulturen ohne Molybdänzusatz verhältnismäßig viel Stickstoff gebunden hatten, also wahrscheinlich mit den eingeimpften Algen aus molybdänhaltiger Kultur auch reichliche Mengen dieses Spurenelements übernommen worden waren, wurden die Stammkulturen künftig wieder in der unveränderten Grundnährlösung gezogen.

Wenn das Nachlassen in der Entwicklungsfreudigkeit der Algen, die im Sommer 1939 wieder etwas größer war, überhaupt allein auf eine Schwächung der Stickstoffbindung zurückzuführen war, dann hätte sich dieser Mangel durch eine geringe Gabe gebundenen Stickstoffs ausgleichen lassen müssen. In einem Versuch mit sieben verschiedenen Arten wurde diese Frage nochmals geprüft. Es ergab sich aber, daß sie alle durch die Nitratgabe ebenso wenig wie durch Erdextrakt in ihrer Entwicklung über das von Molybdän allein schon bewirkte Maß hinaus

[1] Der hohe Wert für die eine Kultur von *A. torulosa* in molybdänhaltiger Lösung bildet eine nicht erklärbare Ausnahme.

dann gefördert, wenn die Bakterien unter dem Einfluß ungünstiger Wetterverhältnisse standen. Solche Wettereinflüsse konnten auch bei den Algen vorliegen. Jedoch blieb den Versuchen, die sich von November 1938 bis Mai 1939 hinzogen, diesmal der Erfolg versagt. Schließlich wurden den Nährlösungen auch noch eine Spur Jodkalium und 10% unveraschter Erdextrakt zugefügt. Aber auch das änderte nichts.



Abb. 4. Fördernder Einfluß des Molybdäns auf absolut reine und bakterienhaltige Kulturen der Gattungen *Nostoc*, *Anabaena* und *Cylindrospermum*.
Reihenfolge der Arten in zwei Säulen von oben nach unten:

Gu 10, rein (*A. variabilis*),	Gu 2, rein (*N. punctiforme*),
Gu 12 (*A. variabilis*),	R 2, rein (*N. punctiforme*),
O 3, rein (*A. humicola*),	Gu 16 (*A. Hallensis*),
O 2, rein (*A. variabilis*),	Gö 1, rein (*N. paludosum*),
D 2 (*N. punctiforme*),	D 8, rein (*C. maius*),
D 1 (*N. calcicola*),	Gu 6 (*N. punctiforme*),
D 6, rein (*A. variabilis*),	O 4, rein (*C. licheniforme*),
R 1 (*N. punctiforme*),	Gu 13, rein (*A. cylindrica*),
Gö 4, rein (*C. licheniforme*),	O 1, rein (*A. variabilis*).

Jeweils von links nach rechts: Ohne Zusatz, + V, + Mo. 7. Oktober bis 7. November 1938.

Etwas besser entwickelten sich die Algen wieder, nachdem die Kulturen nicht mehr wie bisher in Nährlösung ohne Molybdatzusatz fortgezüchtet wurden, sondern in diese Reihe Ende Mai 1939 Nährlösung mit 0,001% Natriummolybdat eingeschaltet wurde. Schon die Ab-

impfungen hiervon in abermals molybdänhaltige Lösung wuchsen etwas kräftiger als entsprechende Kulturen, die aus molybdänfreier Lösung beimpft worden waren. Die ausschließliche Züchtung der Stammkulturen in molybdänhaltiger Nährlösung hatte allerdings den Nachteil, daß die für die Versuche benutzten Ausgangskulturen kein molybdänarmes Impfmaterial lieferten. Das ist an dem verhältnismäßig hohen Stickstoffgewinn in den Kontroll-Nährlösungen des folgenden Versuchs in Tabelle IX zu erkennen der die Frage beantworten sollte, ob unveraschter Erdextrakt, neben Molybdat verabreicht, die Stickstoffbindung etwa noch weiter fördern würde.

Tabelle IX. Wirkung von Molybdän und Erdextrakt auf *Nostocaceen*. 10. Juni bis 9. August 1939.

Grundnährlösung	mg N in 100 ccm							
	D 4 (*N. calcicola*)		Gu 10 (*A. variabilis*) rein		Gu 14 (*A. torulosa*) rein		D 8 (*C. maius*) rein	
Ohne Zusatz	10,9	12,0	8,3	8,5	10,5	9,9	8,3	9,0
+ 0,001 % $Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$	15,0	15,0	11,9	12,5	14,7	21,6*	9,9	12,0
+ 0,001 % $Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$ + Erdextrakt	15.7	16.2	13.6	14.1	13.7	14.8	10.4	10.8

* Der hohe Wert für die eine Kultur von *A. torulosa* in molybdänhaltiger Lösung bildet eine nicht erklärbare Ausnahme.

Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß der Erdextrakt selbst etwas Stickstoff enthält, muß aus den Analysen gefolgert werden, daß er die eindeutig fördernde Wirkung des Molybdäns nicht zu steigern vermag. Im ganzen gesehen, wurde auch in dieser verhältnismäßig langen Versuchszeit von 8 Wochen wenig Stickstoff gebunden[1]. Da außerdem die Kontrollkulturen ohne Molybdänzusatz verhältnismäßig viel Stickstoff gebunden hatten, also wahrscheinlich mit den eingeimpften Algen aus molybdänhaltiger Kultur auch reichliche Mengen dieses Spurenelements übernommen worden waren, wurden die Stammkulturen künftig wieder in der unveränderten Grundnährlösung gezogen.

Wenn das Nachlassen in der Entwicklungsfreudigkeit der Algen, die im Sommer 1939 wieder etwas größer war, überhaupt allein auf eine Schwächung der Stickstoffbindung zurückzuführen war, dann hätte sich dieser Mangel durch eine geringe Gabe gebundenen Stickstoffs ausgleichen lassen müssen. In einem Versuch mit sieben verschiedenen Arten wurde diese Frage nochmals geprüft. Es ergab sich aber, daß sie alle durch die Nitratgabe ebenso wenig wie durch Erdextrakt in ihrer Entwicklung über das von Molybdän allein schon bewirkte Maß hinaus

[1] Der hohe Wert für die eine Kultur von *A. torulosa* in molybdänhaltiger Lösung bildet eine nicht erklärbare Ausnahme.

gefördert wurden. Die Stickstoffwerte in Tabelle X liegen in den anfangs nitrathaltigen Lösungen durchschnittlich nicht höher als in den ursprünglich stickstofffreien, molybdänhaltigen Lösungen. Die seit Ende 1938 beobachtete Depression im Algenwachstum konnte also nicht durch Stickstoffmangel hervorgerufen sein.

Tabelle X. Wirkung von Molybdän, Erdextrakt und Nitratstickstoff auf *Nostocaceen*.

15. August bis 15. September 1939.

Bezeichnung der Algenkulturen	mg N in 100 ccm der Nährlösung							
	ohne Zusatz		+ 0,001 % $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$		+ 0,001 % $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ + Erdextrakt		+ 0,001 % $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ + 0,04 % $Ca(NO_3)_2$	
D 1 (*N. calcicola*)	4,9	4,8	7,7	7,8	7,3	7,8	7,0	7,1
R 1 (*N. punctiforme*) ..	3,9	3,8	6,9	7,1	8,4	8,3	7,4	6,7
D 6 (*A. variabilis*) rein .	3,1	3,4	5,3	5,5	6,6	7,1	6,2	7,0
Gu 6 (*N. punctiforme*) .	6,3	5,3	7,8	8,1	7,6	6,7	6,9	7,1
Gu 16 (*A. Hallensis*) rein	4,5	5,0	7,3	7,6	7,0	7,3	5,2	7,4
O 3 (*A. humicola*) rein .	5,2	6,8	8,4	8,5	8,5	9,1	7,6	8,3
D 8 (*C. maius*) rein ...	4,9	5,3	6,9	6,9	6,4	8,3	6,3	7,4

Das Nächstliegende, was danach noch als Ursache in Frage kam, war eine mangelhafte Kohlenstoffversorgung. Zwar mochte ungünstiges Wetter mitgewirkt haben, aber das konnte nicht die alleinige Ursache



Abb. 5. Fördernder Einfluß einer Durchgasung mit Bodenluft auf O 3 (*A. humicola*) rein, hintere Reihe, und Gu 6 (*N. punctiforme*), vordere Reihe. Von links nach rechts abwechselnd + und — Mo. 4. Oktober bis 1. November 1939.

sein. *Allison* und Mitarbeiter (2) haben schon den fördernden Einfluß einer Durchlüftung auf die Algenkulturen festgestellt. So war die Möglichkeit gegeben, daß im vorliegenden Falle vielleicht die Kohlensäure-Assimilation, vielleicht aber auch die Sauerstoff-Versorgung der Algen infolge mangelhafter Lüftung gehemmt war.

Um die künstliche Lüftung der Algenkulturen den natürlichen Standortsbedingungen möglichst anzupassen, wurde die Luft von einer Kleinmotorpumpe zuerst durch eine Waschflasche mit Wasser, dann durch eine solche mit Mistbeeterde und anschließend durch sterile Wattefilter in die Nährlösungen der Kulturkölbchen gedrückt, wie aus Abb. 5 zu entnehmen ist. Schon nach 10 Tagen entwickelten sich die auf diese Weise gelüfteten Kulturen deutlich besser als die nicht mit Bodenluft durchgasten Vergleichskulturen, insbesondere wurde die fördernde Wirkung des Molybdäns durch die Lüftung noch verstärkt. Dieser aus dem äußeren Erscheinungsbild der Kulturen abgeleitete Befund konnte durch die in Tabelle XI beigefügten Stickstoffanalysen bestätigt werden, obwohl die Unterschiede zwischen den Parallelkulturen teilweise sehr groß sind.

Tabelle XI. Einfluß einer Durchgasung mit Bodenluft auf *Nostocaceen*.

4. Oktober bis 1. November 1939.

Grundnährlösung	mg N in 100 ccm			
	Gu 7 (*N. punctiforme*)		O 3 (*A. humicola*) rein	
Ohne Zusatz	2,9	3,8	2,4	2,4
+ 0,001 % $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	6,3	5,5	4,2	4,9
Ohne Zusatz, gelüftet	2,5	2,8	2,5	2,7
+ 0,001 % $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, gelüftet	12,0	8,8	9,7	8,8

Da *Allison* und Mitarbeiter (2) schon festgestellt hatten, daß ihre *Nostocaceen* am besten gediehen, wenn sie mit einer an Kohlensäure etwas reicheren Luft versorgt wurden, so war auch im Falle des hier erwähnten Versuchs anzunehmen, daß die Bodenluft wegen ihres erhöhten Kohlensäuregehalts den Algen besonders zugesagt hatte. Um diese Frage zu beantworten, wurde am 18. November 1939 ein weiterer Versuch mit *A. humicola* in Reinkultur ausgeführt, wobei ein Gemisch von etwa 1 Teil gewaschener aus Marmor und Salzsäure dargestellter Kohlensäure und etwa 20 Teilen Luft[1] die Erlenmeyerkölbchen durchströmte.

Am 7. Dezember wurde die Durchlüftung eingestellt, da bis zu diesem Tage eine deutliche Hemmung der mit dem Gasgemisch versorgten Kulturen im Vergleich mit den nicht gelüfteten festgestellt wurde. In den gelüfteten molybdänfreien Lösungen war die Alge sogar völlig verschwunden. Der Kohlensäuregehalt der Luft war offensichtlich zu hoch gewesen und hatte auf die molybdänfreien Kulturen tödlich ge-

[1] Diese Mischung hat *Pirson* (21) mit bestem Erfolg bei seinen Untersuchungen an *Chlorella* verwandt.

wirkt. Bezeichnenderweise war diese Wirkung durch Molybdän so weit abgeschwächt worden, daß die eingeimpften Algen wenigstens am Leben blieben und sich sogar noch etwas vermehren konnten. Da Molybdän die Assimilation des Luftstickstoffs fördert, vermochte es wahrscheinlich durch Beschleunigung der Eiweißsynthese, also Bindung des großen Kohlenstoffüberschusses, die Kohlensäurevergiftung zu verhindern.

Klarer war diese Eigenschaft des Molybdäns in der Folgezeit zu erkennen, als die Kulturen keine zusätzliche Kohlensäure mehr erhielten, die Nährlösungen in den gelüfteten Kölbchen aber mit diesem Gas noch angereichert waren. Jetzt entwickelte sich hier die Alge in den molybdänhaltigen Lösungen sehr viel kräftiger als in den entsprechenden ehemals ungelüfteten Kölbchen. Nur in den durchgasten Lösungen ohne Molybdänzusatz blieb jede Entwicklung aus, da, wie bereits erwähnt, die eingeimpften Algen unter dem zu hohen Kohlensäuredruck abgestorben waren. Am 3. Januar 1940 wurden die Kulturen folgendermaßen begutachtet (Tabelle XII):

Tabelle XII. Einfluß einer Durchgasung mit kohlensäurereicher Luft auf *Anabaena humicola*.

18. November 1939 bis 3. Januar 1940.

Grundnährlösung	Algenwachstum	Grundnährlösung	Algenwachstum
Nicht gelüftet	×	Gelüftet	0
„ „ + Mo	××	„ + Mo	××××

0 = Lösungen algenfrei, × = sehr schwach, chlorotisch, ×× = schwach, blaugrün, ×××× = sehr stark, dunkel blaugrün.

Wenn die Kulturen also überhaupt durch kohlensäurereiche Luft gefördert werden sollen, dann darf der Kohlensäuredruck auf keinen Fall sehr weit über dem durchschnittlichen Wert der atmosphärischen Luft liegen. *Allison*, *Hoover* und *Morris* (2) haben als günstigstes Gemisch eine Luft mit 1 % Kohlensäure verwendet. Demnach liegt die optimale

Tabelle XIII. Einfluß einer Belüftung mit Gewächshausluft und mit Bodenluft auf *Anabaena torulosa*.

17. Januar bis 16. Februar 1940.

Grundnährlösung	mg N in 100 ccm	
Ohne Zusatz	3,9	4,1
+ 0,001 % $Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$	6,0	6,2
Ohne Zusatz, belüftet mit Gewächshausluft	4,6	5,9*
+ 0,001 % $Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$, belüftet mit Gewächshausluft	11,1	11,2
Ohne Zusatz, belüftet mit Bodenluft	3,8	4,3
+ 0,001 % $Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$, belüftet mit Bodenluft	11,3	12,9

* In diesen Kolben war infolge Störung der Pumpe verunreinigtes Wasser eingedrungen

Kohlensäurekonzentration für *Nostocaceen* niedriger als für die Grünalge *Chlorella* (21). Ein Versuch mit der Alge Gu 14 (*Anabaena torulosa*) zeigte dementsprechend, daß die Luft des Gewächshauses mit der im Versuch der Tabelle XI verwendeten Bodenluft annähernd gleichwertig war (Tabelle XIII). Der Versuch wurde im übrigen genau so ausgeführt wie in Abb. 5 angegeben, unter Fortlassung einer der beiden mit Erde gefüllten Flaschen.

Danach steht fest, daß *Nostocaceen* bei ausreichender Versorgung mit Wasser, mineralischen Nährstoffen einschließlich Molybdän, Licht und Luft beträchtliche Mengen Stickstoff zu binden imstande sind. Unter Ausnutzung der Energie des Sonnenlichtes bilden sie also organische Substanz unter ausschließlicher Verwendung der Luft als Kohlenstoff- und zugleich als Stickstoffquelle.

III. Symbiontische Nostocaceen (Anabaena azollae).

Gleichzeitig mit den vorstehend geschilderten Untersuchungen an frei im Boden und Wasser lebenden *Nostocaceen* sollte auch die von *Azolla* beherbergte *Anabaena* auf stickstoffbindende Fähigkeit und Molybdänbedürftigkeit untersucht werden. Zwar war schon von vornherein in Analogie zu den stickstoffbindenden Bakterien anzunehmen, daß auch die in höheren Pflanzen vorkommenden blaugrünen Algen den Luftstickstoff fixieren und dementsprechend diese Lebensgemeinschaften auch durch Molybdän in ihrer Entwicklung gefördert würden. Jedoch sind einige Autoren anderer Meinung gewesen, und die Frage, ob sich diese Lebensgemeinschaften stickstoffautotroph ernähren können oder nicht, ist bis heute nicht endgültig entschieden worden.

Zuerst haben *Oes* (20) und gleichzeitig *Mameli* und *Polacci* (17) festgestellt, daß die anabaenahaltige *Azolla* Stickstoff binde, und daß hierfür sehr wahrscheinlich die *Anabaena* verantwortlich zu machen sei. *Pringsheim* (22) hat dann aber diese Auffassung nicht bestätigt. Er konnte weder bei *Anabaena azollae* noch bei *Anabaena cycadeae* oder dem endophytischen *Nostoc punctiforme* Stickstoffbindung nachweisen. Was diese *Nostoc*-Art betrifft, so hat *Harder* (13) ein Jahr später sogar die Ansicht vertreten, daß die Alge ein „fakultativer Parasit" und das Zusammenleben mit *Gunnera* eine „harmlose Erkrankung" derselben sei. *Winter* (31) gelangte aber zu einer anderen Auffassung. Er konnte mit Reinkulturen von den Nostocaceen aus *Gunnera* und *Cycas* bei kohlenstoffheterotropher Ernährung der Algen Stickstoffgewinne erzielen, die allerdings nur gering waren. Die endophytische Lebensweise der Blaualgen wurde nicht als Parasitismus, sondern als Symbiose bezeichnet. Auch *Molisch* (19) hat gezeigt, daß *Nostoc sphaericum* in den Atemhöhlen der Lebermoose *Blasia pusilla* und *Cavicularia densa* den Luftstickstoff assimiliert. Andererseits sind aber *Huneke* (15) und *Wildemann* (29) wieder zu der Überzeugung gekommen, daß der Wasserfarn *Azolla* und sein Symbiont *Anabaena* zwar mit sehr wenig Stickstoff leben, aber die „Azollen trotz Symbiose mit *Anabaena* auf stickstofffreiem Nährboden nicht normal gedeihen können". Stickstoffbindung wurde nicht

nachgewiesen, und das Zusammenleben der Alge mit dem Farn wird darum zum Teil immer noch als reiner Raumparasitismus aufgefaßt [*Huneke* (15), *Wildemann* (29), *Geitler* und *Pascher* (10)].

Nachdem die Bedeutung des Molybdäns für die biologische Stickstoffbindung erkannt worden war, schien jedoch auch hier die Möglichkeit gegeben, daß in all den Fällen, in denen keine Stickstoffbindung festgestellt werden konnte, die verwendeten Nährmedien nicht genügend Molybdän enthielten.

Um zunächst im Falle *Azolla* eine Klärung herbeizuführen, wurden einige Pflanzen von *Azolla caroliniana* aus einem Wasserbecken des Botanischen Gartens in Berlin-Dahlem entnommen, in 750 ccm fassende Erlenmeyerkolben auf je 200 ccm Grundnährlösung, zum Teil mit verschiedenen Zusätzen, verpflanzt und im Gewächshaus weiter gezüchtet. Die abgeänderten Grundnährlösungen enthielten teils 0,001 % $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, teils 0,0005 % $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ und teils 0,000025 % $NaVO_3 \cdot 4H_2O$. Die Besetzung der Lösungen mit je einem kleinen Pflänzchen erfolgte am 13. August 1936. Am 7. November 1936 wurden die Nährlösungen erneuert unter Verwendung von nur 0,0001 % $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0,00005 % $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ bzw. 0,00001 % $NaVO_3 \cdot 4H_2O$. Denn bis dahin hatten sich die Kontrollpflanzen auf der Grundnährlösung ohne Zusatz fast noch besser entwickelt als die Pflanzen auf molybdän-, vanadium- oder wolframhaltiger Lösung. Wolfram hatte die Azollen sogar ungünstig beeinflußt. Am 7. Januar 1937 waren in dieser Lösung die meisten Pflanzen bereits abgestorben, weshalb vorläufig nur die Wirkung von Molybdän und Vanadium untersucht wurde.

Die am 2. Februar 1937 nach *Kjeldahl* ermittelten Stickstoffgehalte (Tabelle XIV) deuten zweifellos auf Stickstoffbindung und berechtigen trotz der geringen Unterschiede zu der Annahme, daß Vanadium und noch mehr Molybdän die Aufnahme des elementaren Stickstoffs gefördert haben. Denn ebenso wie bei den frei lebenden *Nostocaceen* mußte auch hier berücksichtigt werden, daß die erst vor kurzem ihrem natürlichen Standort, einem schlammigen Wasser, entnommenen Impfpflanzen wahrscheinlich noch reichlich Molybdän oder ähnlich wirkende Spurenelemente enthalten hatten, und daß deshalb die Molybdän- und Vanadiumgaben die Entwicklung nicht noch mehr fördern konnten.

Tabelle XIV. Wirkung von Vanadium und Molybdän auf anabaenahaltige *Azolla*.

13. August 1936 bis 2. Februar 1937.

Grundnährlösung	mg N in der gesamten Kultur	Grundnährlösung	mg N in der gesamten Kultur
Frisch beimpft (Kontrolle)	0,2	+ V	9,6
Ohne Zusatz	6.8	+ Mo	10,1

Darum wurde ein zweiter Versuch aus dem ersten in folgender Weise beimpft: Je ein sehr kleines aber grünes Pflänzchen wurde am 7. Januar 1937 übertragen

aus einer Grundnährlösung (—) in eine ebensolche (— —),
„ „ „ (—) in eine vanadiumhaltige Lösung (—V),
„ „ „ (—) in eine molybdänhaltige Lösung (—Mo),
„ „ vanadiumhaltigen Lösung (V) in eine Grundnährlösung (V—),
„ „ „ „ (V) in eine vanadiumhaltige Lösung (VV),
„ „ molybdänhaltigen Lösung (Mo) in eine Grundnährlösung (Mo—),
„ „ „ „ (Mo) in eine molybdänhaltige Lösung (MoMo).

Die Molybdat- und Vanadatkonzentrationen waren diesmal 0,00005 bzw 0,00001 %. Am 30. März 1937 wurden die Kulturen folgendermaßen begutachtet:

— —: Wenig *Azolla*, stark chlorotisch.
—V: Etwas mehr *Azolla*, stark chlorotisch, bläulich grüner Algenrasen am Glas.
—Mo: Noch mehr *Azolla*, aber auch chlorotisch. Bläulich grüner Algenrasen am Glas.
V—: Viel *Azolla*, grün, in der Nährlösung etwas *Anabaena*.
VV: Weniger *Azolla*, grün, viel *Anabaena* in der Nährlösung.
Mo—: Wenig *Azolla*, grün, sehr viel *Anabaena* in der Nährlösung.
MoMo: *Azolla* tot bis auf 1 bis 3 sehr kleine Pflänzchen, sehr viel *Anabaena* in der Nährlösung.

Die Kulturen Mo— und noch mehr MoMo erweckten den Eindruck, als seien die Azollen von den sehr dichten *Anabaena*-Watten erstickt worden. Denn die wenigen Pflanzen, die sich hatten entwickeln können, waren grün und sahen auch im übrigen gesund aus. Die reichliche Versorgung mit Vanadium und Molybdän hatte also die Alge so sehr in ihrem Wachstum begünstigt, daß sie der *Azolla* den Lebensraum streitig machen konnte. Beim mikroskopischen Vergleich dieser *Anabaena* mit der in den Blatthöhlen der *Azolla* lebenden ergaben sich keine nennenswerten Unterschiede, so daß die Vermutung auftauchte, beide seien miteinander identisch, *Anabaena azollae* sei also aus den Blatthöhlen in die molybdän- oder vanadiumhaltigen Nährlösungen hineingewachsen.

Das konnte auch deshalb angenommen werden, weil die äußerlich algenfreien, aber trotzdem nur sehr schwach entwickelten und chlorotisch gefärbten Kulturen — —, —V, und —Mo ausschließlich aus Pflanzen bestanden, die auch in den Blatthöhlen keine *Anabaena* enthielten. Vielleicht hatte deshalb keine freie Entwicklung von *Anabaena* stattfinden können, obwohl in einem Teil der beimpften Lösungen genügende Mengen des fördernden Spurenelements Molybdän zur Verfügung standen.

Das Fehlen eines solchen lästigen Konkurrenten in der Nährlösung hätte eigentlich die Entwicklung der Azollen mehr fördern müssen. Zumindest hätten sie auf der molybdänhaltigen Lösung kräftig wachsen müssen, wenn sie selbst den Stickstoff zu binden in der Lage wären. Jedoch wies die chlorotische Farbe der Pflanzen auf Stickstoffmangel hin. Sie waren aus Impfpflanzen hervorgegangen, die auf molybdän freier Grundnährlösung gewachsen waren und hatten, wie später noch wiederholt bestätigt werden konnte, ihren Symbionten infolge Mangels an Molybdän verloren. Da *Huneke* (15) und *Wildemann* (29) anabaenafreie Azollen besonders leicht in Stickstoff-Hungerkulturen erhielten, ist die Wirkung des Molybdäns auf die *Azolla-Anabaena*-Gemeinschaft ähnlich derjenigen des Stickstoffs. Abimpfungen von den chlorotischen, völlig anabaenafreien Kulturen auf Grundnährlösung mit 0,0001 % Molybdat und zum Teil auch mit 0,05 % Natriumnitrat ergrünten auf den nitrathaltigen Lösungen und entwickelten sich hier normal, während sie auf den nitratfreien Lösungen sehr bald völlig eingingen, ohne sich nennenswert vermehrt zu haben. Hieraus kann geschlossen werden, daß ausschließlich *Anabaena azollae* und nicht *Azolla* selbst zur Stickstoffbindung befähigt ist.

Da *Anabaena* aus den Azollen in stickstofffreier Lösung nur dann leicht verschwindet, wenn gleichzeitig Molybdän fehlt, so muß dieses Element für die Stickstoffbindung der *Anabaena* notwendig sein. Welchen Schutz das Molybdän für eine stickstoffbindende Alge bei erhöhtem Kohlensäuredruck darstellen kann, wurde oben gezeigt. Es ist naheliegend, auch für den natürlichen Lebensraum der *Anabaena* in den Blatthöhlen der *Azolla* wenigstens zeitweilig höheren als den atmosphärischen Kohlensäuredruck anzunehmen. Das von *Huneke* (15) beobachtete Absterben der *Anabaena* in den stickstofffrei gezogenen Azollen besagt also nicht, wie diese folgerte, daß die Algen „keine Stickstofflieferanten für *Azolla* sein können“. Vielmehr konnte *Anabaena* den Stickstoff nicht binden, weil ihre Nährlösung kein Molybdän enthielt. Die Algen sterben in den Blättern auf molybdänfreier Lösung vielleicht nur deshalb ab, weil sie von *Azolla* zunächst noch mit Kohlensäure sehr reichlich versorgt werden.

Wie aus den Ergebnissen der Versuche mit den frei lebenden *Nostocaceen* gefolgert werden muß, haben die blaugrünen Algenrasen in —V und —Mo Stickstoff gebunden, von dem auch die Azollen vermutlich geringe Spuren geliefert bekommen haben. So ist wahrscheinlich die unbedeutende Wachstumsförderung der Azollen in diesen Lösungen zu erklären.

Um zu prüfen, ob die in V—, VV, Mo— und MoMo außerhalb des Wasserfarns so kräftig entwickelte *Anabaena* tatsächlich mit *Anabaena azollae* identisch wäre, wurde die freilebende Form durch mehrfaches

Überimpfen auf festen Nährboden, bestehend aus Grundnährlösung mit 0,0001 % Molybdat und 2 % Agar artrein gezüchtet und dann in verschiedener Weise in verschiedenen Nährlösungen mit anabaenafreien Azollen in Berührung gebracht. Eine Neuinfektion derselben erfolgte jedoch ebenso wie in *Hunekes* und *Wildemanns* Versuchen in keinem einzigen Falle, so daß die in der Nährlösung angewachsene *Anabaena* trotz weitgehender morphologischer Übereinstimmung mit der von der *Azolla* in ihren Blättern beherbergten Form möglicherweise doch eine andere Art oder Varietät darstellte, die dem Wasserfarn nur äußerlich angehaftet hatte.

Bevor dieser Frage weiter nachgegangen wurde, schien es angebracht, die Wirkung des Molybdäns auf *Azolla* unter mehr natürlichen Verhältnissen zu untersuchen. Es galt erstens festzustellen, welche Molybdänkonzentration die Entwicklung der *Azolla* in stickstofffreier Nährlösung bei möglichst guter Lüftung am stärksten förderte, und zweitens wie sich die Pflanzen bei Anwesenheit der auch am natürlichen Standort im Teichwasser vorhandenen Kleinkrebse verhalten würden. Für diese bilden die *Nostocaceen* einen wesentlichen Bestandteil der Nahrung, so daß es vielleicht mit Hilfe einiger dieser Tiere möglich war, ein Überhandnehmen blaugrüner Algen in der Nährlösung zu verhindern.

Kultiviert wurde in 200 ccm fassenden Kalischalen aus Jenaer Geräteglas Nr. 20 in jeweils 150 ccm Grundnährlösung, zum Teil mit Zusätzen von 0,15 γ, 15 γ oder 1,5 mg $Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$ je Schale. In eine von den jeweils 2 Schalen wurden 4 *Ostracoden* und 4 *Daphnien* ausgesetzt. Die Beimpfung erfolgte dann gleichmäßig mit je einem kleinen grünen, anabaenahaltigen Pflänzchen einer Kultur, die nach der oben erläuterten Beschriftungsweise mit Mo — — bezeichnet war. Diese Kultur machte im ganzen einen chlorotischen Eindruck.

Das Ergebnis des Versuchs in Tabelle XV lehrt, daß erstens die günstigste Molybdänkonzentration etwas niedriger liegt als bei den

Tabelle XV. Wirkung von Kleinkrebsen und verschiedenen Molybdänkonzentrationen auf *Azolla*.
13. September bis 27. Oktober 1937.

Grundnährlösung	mg N in		
	Nährlösung	*Azolla*	Gesamtkultur
Frisch beimpft (Kontrolle)	—	—	0,1
Ohne Zusatz	2,6	0,4	3,0
+ Kleinkrebse	0,6	2,9	3,5
+ 0,000 000 1 % $Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$	4,3	0,5	4,8
+ 0,000 000 1 % $Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$ + Kleinkrebse	0,4	7,1	7,5
+ 0,000 01 % $Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$	4,3	1,3	5,6
+ 0,000 01 % $Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$ + Kleinkrebse	0,5	7,9	8,4
+ 0,001 % $Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$	4,0	1,0	5,0
+ 0,001 % $Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$ + Kleinkrebse	0,5	?*	etwa 7,0

* Bei der Analyse verunglückt.

frei lebenden *Nostocaceen*, nämlich etwa zwischen 0,00001 und 0,0001 % $Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$, und zweitens unter dem Einfluß der Kleinkrebse die Stickstoffbindung der Azollen mit ihrer symbiontischen *Anabaena* noch weiter gefördert wird auf Kosten einer *Nostocaceen*-Entwicklung in der Nährlösung. Dabei ist der Stickstoffgewinn durch die *Azolla-Anabaena*-Symbiose bei Gegenwart der Kleinkrebse absolut größer als durch die in der Lösung wachsenden *Nostocaceen* mit der schwächer entwickelten *Azolla*. Daß die Kleinkrebse die freie Entfaltung der *Azolla* und dadurch einen größeren Stickstoffgewinn ermöglicht haben, ist aus



Abb. 6. Einfluß von Kleinkrebsen und steigenden Molybdängaben auf *Azolla*. Obere Reihe ohne, untere mit Kleinkrebsen, jeweils von links nach rechts: Ohne Zusatz; + 0,0000001 % $Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$; + 0,00001 % $Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$; + 0,001 % $Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$. 3. September bis 27. Oktober 1937.

Abb. 6 deutlich zu ersehen. Wahrscheinlich ist außerdem der Stickstoff der von den Tieren gefressenen *Nostocaceen* auf dem Umweg über die tierischen Exkremente und unter bakteriellem Einfluß mineralisiert und so den Azollen verfügbar geworden. Wie später noch gezeigt werden wird, wirkt eine kleine Stickstoffgabe fördernd auf die Stickstoffbindung der *Azolla-Anabaena*-Symbiose.

Um nun *Azolla* künftig auch ohne Mithilfe von Kleintieren von im Wasser wachsenden Blaualgen unbehelligt kultivieren zu können, wurde am 3. November 1937 jeweils eine kräftige Pflanze im Reagensglas in 50- bis 70 %igem Alkohol eine bis mehrere Sekunden lang geschüttelt, dann in sterile molybdänhaltige Grundnährlösung übertragen, wo sie entweder so belassen oder mit einem abgeflammten Platinspatel zerdrückt wurde. Auf die Weise gelangte die Alge aus den Blatthöhlen in die Nährlösung.

Von sämtlichen so angelegten Röhrchenkulturen sind nur zwei sterilisierte *Azolla*-Pflanzen lebendig geblieben und haben sich vermehrt. Sie wurden am 6. Dezember 1937 in je 100 ccm sterile[1] molybdänhaltige Grundnährlösung in 300 ccm fassenden Erlenmeyerkolben übertragen. In den mit zerdrückten Pflanzen beimpften Röhrchen haben sich auch nach Monaten keine Algen entwickelt.

Am 26. Februar 1938 konnte mit den sterilisierten Azollen ein vorläufiger Versuch durchgeführt werden, der in erster Linie zeigen sollte, wie sich die bis dahin mit Molybdän versorgten Pflanzen auf einfacher und auf molybdän-, vanadium- oder wolframhaltiger Grundnährlösung entwickeln würden.

Dem schon erwähnten ausgeprägten Speicherungsvermögen der *Azolla* für Molybdän entsprechend sind die Unterschiede in Entwicklung und Stickstoffbindung kaum bemerkbar (Tabelle XVI). Eine fördernde Wirkung kann höchstens Molybdän und Wolfram in ganz bescheidenem Maße zuerkannt werden.

Tabelle XVI. Wirkung von Molybdän, Vanadium und Wolfram auf äußerlich algenfreie Azollen.

26. Februar bis 28. April 1938.

Grundnährlösung	mg N	
Ohne Zusatz	2,1	3,0
+ 0,000 001 % $NaVO_3 \cdot 4\,H_2O$	2,4	2,6
+ 0,000 01 % $NaWO_4 \cdot 2\,H_2O$	3,3	3,7
+ 0,000 01 % $Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$	3,3	3,6
Filter* + Impfpflanze	0,1	

* Hier wie bei den folgenden Versuchen wurden die Pflanzen von der Nährlösung abfiltriert und im Falle, daß diese Nitrat enthielt, gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen und dann mitsamt dem Filter aufgeschlossen.

Im Gegensatz zu den Feststellungen bei früheren Versuchen mit nicht sterilisierter *Azolla* war während der ganzen Versuchszeit in keinem der Kulturkolben eine freie Entwicklung der Algen zu sehen. Auch in den noch folgenden Versuchen blieben die Nährlösungen stets algenfrei. Daraus muß abermals geschlossen werden, daß die oben genannte, durch Molybdän und Vanadium in ihrer Vermehrung so auffällig geförderte *Anabaena* doch nicht identisch war mit *Anabaena azollae*. Hierfür spricht ferner die Tatsache, daß auch zahllose weitere Bemühungen verschiedener Art, diese *Anabaena* außerhalb der Blatthöhlen des Wasserfarns in einer Nährlösung zu kultivieren, erfolglos blieben. Nicht nur

---

[1] Hier und bei allen folgenden Versuchen wurden nur noch im Autoklaven bei 120° C sterilisierte Nährlösungen in 300 ccm fassenden Erlenmeyerkolben verwendet.

durch Zerdrücken der Pflanzen in Nährlösung, sondern auch durch Herauspräparieren der Algen in makroskopisch erkennbarer Menge und Übertragung derselben in verschiedene Nährlösungen wurde an das von anderen Autoren offenbar mühelos erreichte Ziel zu gelangen versucht. Hierzu wurden außer der Grundnährlösung mit und ohne Molybdän oder Calciumnitrat auch noch *Beijerinck*sche Lösung, bestehend aus Leitungswasser und Dikaliumphosphat, sowie diese mit Molybdänzusatz verwendet. Die 100 ccm fassenden Erlenmeyerkolben mit 20 ccm Nährlösung standen teils in diffusem Tageslicht und Sonnenlicht unter Ölpapier, teils auch in einer grün gefärbten Flüssigkeit bis zum Hals eingetaucht, um so die Farbe des Blattgrüns zu ersetzen. Jedoch waren alle diese Maßnahmen vergeblich. Auch nach 3 Monaten war noch keine Spur von Algenentwicklung zu erkennen. Vielmehr war sogar das eingeimpfte Material völlig verschwunden. Das ist um so verwunderlicher, als die Isolierung symbiontischer Blaualgen anderen Untersuchern wiederholt gelungen ist.

So hat *Molisch* (19) *Nostoc sphaericum* aus Lebermoosen isolieren können, *Harder* (13) und *Pringsheim* (22) züchteten *Nostoc punctiforme* und *Anabaena cycadeae* aus *Gunnera*-Rhizomen bzw. aus *Zycas*-Wurzeln, und der letztere Autor hat außerdem ebenso wie *Huneke* (15) und *Wildemann* (29) *Anabaena azollae*, wenn auch teilweise aus einer anderen *Azolla*-Art, außerhalb des Farns kultiviert. Warum mir das gleiche mit *Anabaena* aus *Azolla caroliniana* nicht gelungen ist, vermag ich mit Sicherheit nicht zu sagen. Allerdings hat *Pringsheim* die Azollen vor dem Herauspräparieren der Algen nicht äußerlich sterilisiert, und *Huneke* und *Wildemann* haben dies zwar getan, jedoch vielleicht nicht genügend, indem sie die Pflanzen „durch Alkohol gezogen" haben, „um die außen anhängenden Algen möglichst abzutöten". Wenn sie in einer großen Zahl von Isolierungsversuchen immer dieselbe Alge gefunden haben, was mir bei den weniger zahlreichen Versuchen mit nicht sterilisierten Pflanzen nicht anders ergangen ist, so muß das nicht unbedingt für Identität dieser Alge mit *Anabaena azollae* sprechen. Es kann sich vielleicht auch um eine Art ektophytischen Symbionten der *Azolla* handeln. Da ebenfalls *Oes* (20) die freie Kultivierung der *Anabaena azollae* und ferner keinem der erwähnten Autoren die Wiedervereinigung der von ihm gezüchteten *Anabaena* mit algenfreier *Azolla* geglückt ist, darf auf Grund aller vorliegenden Versuchsergebnisse einschließlich der eigenen angenommen werden, daß die Symbiose zwischen *Azolla* und *Anabaena azollae* vielleicht derartig eng ist, daß sich diese Alge wenigstens nicht so leicht wie frei lebende *Nostocaceen* in Nährlösungen kultivieren läßt. Bei anderen endophytischen *Nostocaceen* mögen die Verhältnisse anders liegen. Z. B. muß *Nostoc punctiforme* immer wieder von außen in die *Gunnera*-Rhizome eindringen. Daß diese Alge noch nicht so sehr

auf die symbiontische Lebensweise angewiesen sein wird wie *Anabaena azollae*, die in den besonders für die Symbiose mit der Alge gestalteten Blatthöhlen auch schon am Vegetationspunkt des Farns vorhanden ist, leuchtet ein. Allerdings ist es möglich, daß sich der Farn, wenn auch weniger gut, ohne die Alge am Leben erhält. Unter natürlichen Bedingungen würde ihm ja dann auch Stickstoff in gelöster Form und durch Vermittlung ektophytischer *Nostocaceen* der Luftstickstoff zur Verfügung stehen. Außerdem soll hier nach *Wildemann* (29) Wiedervereinigung mit dem Symbionten vorkommen.

Unter künstlichen Laboratoriumsverhältnissen würde die isolierte Kultur der *Anabaena azollae* vielleicht doch möglich sein, wenn die in den Blatthöhlen vorliegenden Lebensbedingungen für *Anabaena* noch mehr nachgeahmt würden, als es geschehen ist. Dabei ist besonders an die Versorgung mit Kohlensäure oder auch mit organisch gebundenem Kohlenstoff zu denken. Denn nach *Winter* (31) sind die *Nostocaceen* aus *Gunnera* und *Cycas* bezüglich der Kohlenstoffernährung „heterotroph, fakultativ autotroph". Stickstoff wird nur bei Gegenwart von Fructose gebunden. Derartige Versuche mit *Azolla* mußten aber vorläufig zurückgestellt werden.

Aus der Nachkommenschaft der äußerlich sterilisierten Azollen ließen sich bald wieder von einer auf Grundnährlösung ohne Zusatz gezogenen Kultur völlig algenfreie Pflanzen heranziehen, die in nitrathaltiger Lösung zur Vermehrung gebracht wurden. Sie sollten nun in ihrem Verhalten gegenüber Wolfram, Vanadium, Molybdän und Nitratstickstoff mit den anabaenahaltigen verglichen werden. Zu diesem Zweck wurden die Nährlösungen am 28. April 1938 mit je einer grünen Pflanze der anabaenafreien bzw. einer anabaenahaltigen Kultur beimpft, die nach der anfänglichen Züchtung der äußerlich sterilisierten Pflanzen auf molybdänhaltiger Lösung zum ersten Male auf unveränderter Grundnährlösung gewachsen war.

Wenn dadurch auch die Pflanzen anscheinend noch nicht so weit vom Molybdän befreit worden waren, daß sie auf der Grundnährlösung überhaupt nicht mehr Stickstoff zu binden und zu wachsen vermocht hätten, so haben sie doch, wie aus Tabelle XVII zu ersehen ist, auf die Molybdängabe schon etwas deutlicher reagiert als im vorigen Versuch. Im ganzen aber war die Entwicklungsfreudigkeit aller Pflanzen ziemlich gering, und sie ist im folgenden noch geringer geworden. Offenbar sagten ihnen die mit Wattestopfen verschlossenen Erlenmeyerkolben nicht besonders zu. Eine künstliche Lüftung würde wahrscheinlich die *Azolla*-Kulturen in ihrer Entwicklung genau so gefördert haben wie die Algenkulturen. Jedoch konnten solche Versuche nicht mehr ausgeführt werden.

Tabelle XVII. **Wirkung von Molybdän, Vanadium, Wolfram und Nitrat auf äußerlich algenfreie, anabaenahaltige und anabaenafreie Azollen.**

28. April bis 30. Juni 1938.

Grundnährlösung	mg N je Kultur			
	anabaena-haltige *Azolla*		anabaena-freie *Azolla*	
Ohne Zusatz	2,2	2,6	0,1	0,1
+ 0,000 01 % $Na_2WO_4 \cdot 2\,H_2O$	2,7	3,0	—	—
+ 0,000 001 % $NaVO_3 \cdot 4\,H_2O$	1,5	2,0	—	—
+ 0,000 01 % $Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$	3,9	4,9	0,1	0,1
+ 0,1 % $Ca(NO_3)_2 \cdot 4\,H_2O$	5,4	5,5	1,1	1,5
+ 0,1 % $Ca(NO_3)_2 \cdot 4\,H_2O$ + 0,000 01 % $Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$	6,0	6,1	0,6	1,2

Im einzelnen geht aus Tabelle XVII noch hervor, daß Molybdän in seiner Wirkung auf anabaenahaltige *Azolla* vom Wolfram nicht ganz erreicht wurde, und daß Vanadium eher hemmenden als fördernden Einfluß gehabt hat. Noch besser als mit Molybdän konnten sich die Pflanzen mit Nitratstickstoff entwickeln und am besten, wenn ihnen beides zugleich geboten wurde.

Es ist jedoch nicht anzunehmen, daß die Pflanzen selbst ohne Mitwirkung der stickstoffbindenden *Anabaena* den gesamten Stickstoff aus dem Nitrat aufgenommen haben. Denn sonst hätten annähernd dieselben Werte bei den anabaenafreien Pflanzen gefunden werden müssen. Das ist aber nicht entfernt der Fall. Im übrigen haben diese Pflanzen jede Fähigkeit zur Stickstoffbindung eingebüßt, und Molybdän ist für sie gänzlich ohne Bedeutung. Also geht auch hieraus hervor, daß die Bindung des Luftstickstoffs lediglich der in den Blättern von *Azolla* lebenden Alge möglich ist, die für den Farn eine bessere Stickstoffquelle zu sein scheint als Nitrat in der Nährlösung.

Damit diese Fragen weiter geklärt würden, war es notwendig, nicht nur *Azolla*, sondern auch die abfiltrierte nitrathaltige Nährlösung der Analyse zu unterwerfen. Das ist im folgenden Versuch geschehen, der ebenso wie der vorige angesetzt, aber mit einmal mehr auf molybdänfreier Grundnährlösung gezogenen Pflanzen beimpft wurde. Die Vermehrung der Pflanzen war durchweg schwach. Erst nach 4 Monaten war so viel Pflanzenmasse gebildet, daß die Analysen durchgeführt werden konnten (Tabelle XVIII).

Sie lehren aber trotzdem eindeutig, daß nur die anabaenahaltigen Azollen Stickstoff binden, und zwar am besten, wenn ihnen zugleich Molybdän und Nitrat geboten wird. Nitrat wirkt also auf die Stickstoffbindung nicht etwa, wie man erwarten könnte, hemmend, sondern fördernd. Dabei wird nur verhältnismäßig wenig Stickstoff aus dem

Tabelle XVIII. **Wirkung von Molybdän, Vanadium, Wolfram und Nitrat auf äußerlich algenfreie, anabaenahaltige und anabaenafreie Azollen.**

30. Juni bis 31. Oktober 1938.

Grundnährlösung	mg N							
	In der Nährlösung		aufgenommen aus der Nährlösug		in den Pflanzen		gebunden	
Frisch beimpft (Kontrolle)	0,3	—	—	—	—	—	—	—
+ 0,12 % $Ca(NO_3)_2 \cdot 4\,H_2O$ (Kontrolle)	14,4	—	—	—	—	—	—	—
Mit anabaenahaltiger *Azolla*.								
Ohne Zusatz	—	—	—	—	1,0	1,3	0,7	1,0
+ 0,000 01 % $Na_2WO_4 \cdot 2\,H_2O$	—	—	—	—	0,6	1,2	0,3	0,9
+ 0,000 001 % $NaVO_3 \cdot 4\,H_2O$	—	—	—	—	1,7	1,7	1,4	1,4
+ 0,000 01 % $Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$	—	—	—	—	2,4	2,6	2,1	2,3
+ 0,12 % $Ca(NO_3)_2 \cdot 4\,H_2O$ ..	12,0	12,0	2,4	2,4	3,3	3,4	0,9	1,0
+ 0,12 % $Ca(NO_3)_2 \cdot 4\,H_2O$ + 0,000 01 % $Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$	12,8	12,7	1,6	1,7	5,2	5,4	3,6	3,7
Mit anabaenafreier *Azolla*.								
Ohne Zusatz	—	—	—	—	0,3	0,3	0,0	0,0
+ 0,000 01 % $Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$	—	—	—	—	0,4	0,3	0,1	0,0
+ 0,12 % $Ca(NO_3)_2 \cdot 4\,H_2O$	11,5	—*	2,9	—	2,6	—	0,0	—
+ 0,12 % $Ca(NO_3)_2 \cdot 4\,H_2O$ + 0,000 01 % $Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$	11,1	11,8	3,3	2,6	2,9	2,7	0,0	0,1

* Die Parallelkultur ist durch einen Pilz vernichtet worden. *Huneke* (15) hat schon berichtet, daß anabaenafreie Pflanzen leicht von Schimmelpilzen befallen und getötet werden.

Nitrat aufgenommen, gewissermaßen nur zusätzlich. Der Farn muß dadurch in seinem Stoffwechsel, etwa auch in der Kohlensäureproduktion, so gestärkt werden, daß infolgedessen die Alge zu intensiverer Stickstoffbindung angeregt wird und dann der Farn nicht mehr so viel Stickstoff aus dem Nitrat aufzunehmen braucht wie anfangs. Tatsächlich hat er ja auch ohne Molybdän mehr aufgenommen als mit Molybdän, weil im ersteren Falle die Stickstoffbindung gehemmt ist. Auf anderem Wege ist *Oes* (20) ebenfalls zur Überzeugung gekommen, daß die *Azolla-Anabaena*-Lebensgemeinschaft neben dem elementaren Stickstoff auch noch solchen in gebundener Form aufnimmt. Es ist das ein Verhalten, das etwa demjenigen der Leguminosen mit ihren *Knöllchenbakterien* entspricht, die ebenso über eine anfängliche Stickstoffhungerperiode besser hinwegkommen, wenn ihnen etwas Stickstoff in gebundener Form zur Verfügung steht. Schließlich läuft natürlich dieser fördernde Anreiz durch den aufgenommenen Nitratstickstoff auf eine stärkere Vermehrung der *Azolla* und der in ihr enthaltenen *Anabaena* hinaus. So wird die üppige Entwicklung der *Azolla* auf Teich- oder Grabenwasser nicht zu-

letzt deren Gehalt an Stickstoff *und* Molybdän zu verdanken sein. Bei Zusatz von 10% Teichwasser zur molybdänhaltigen Grundnährlösung konnte eine gleiche Wachstumssteigerung erreicht werden wie durch Nitratzusatz (Abb. 7).

Ohne *Anabaena* verhält sich *Azolla* nicht anders als eine stickstoffheterotrophe grüne Pflanze. Stickstoff wird unter keinen Umständen gebunden, Nitratstickstoff auf jeden Fall stärker assimiliert, und ein Zusatz von Molybdän zur Nährlösung ist ohne jede Wirkung.



Abb. 7. Einfluß von Molybdän und Teichwasser auf äußerlich algenfreie, anabaenahaltige *Azolla*.
Von links nach rechts in sterilisierter Grundnährlösung: Ohne Zusatz; + 0,00001% $Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$; + 0,00001% $Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$ und 10% Teichwasser statt H_2O. 27. November 1938 bis 7. März 1939.

Damit dürfte die Bedeutung des Algensymbionten für den Wasserfarn und zugleich dessen Molybdän-Speicherungsvermögen eine zwanglose Erklärung gefunden haben. Der Farn nimmt aus dem Wasser, das am natürlichen Standort wohl niemals gänzlich stickstofffrei ist, geringe, jedoch längst nicht ausreichende Mengen gebundenen Stickstoffs auf, speichert Molybdän und stellt dieses neben Kohlensäure und anderen lebensnotwendigen Mineralien der *Anabaena* zur Verfügung, die ihrerseits mit Hilfe des katalytisch wirksamen Molybdäns Stickstoff bindet und an *Azolla* abgibt.

Zusammenfassung.

1. Wasser- und erdbewohnende *Nostocaceen* binden Luftstickstoff.

2. Hierfür ist es gleichgültig, ob sich die Algen in absoluter Reinkultur befinden oder ob sie mit Bakterien vergesellschaftet sind.

3. Bei ausreichender Belichtung, Belüftung und Versorgung mit den lebensnotwendigen Mineralsalzen wurden bei Anwesenheit einer Spur Molybdän in 4 Wochen und in 100 ccm Nährlösung bei kohlenstoffautotropher Lebensweise bis zu etwa 12 mg Stickstoff gebunden.

4. Ohne Zusatz von Molybdän zur Nährlösung wird nur sehr wenig Stickstoff gebunden, so daß die Notwendigkeit dieses Elementes für die Stickstoffbindung auch dieser Mikroorganismen angenommen werden muß.

5. Aus verschiedenen Ackerböden konnten in stickstofffreier, molybdänhaltiger Nährlösung nur Arten der Gattungen *Nostoc*, *Anabaena* und *Cylindrospermum* isoliert werden. Andere bodenbewohnende Algen scheinen unter diesen Bedingungen keinen Stickstoff zu binden.

6. In besonders humusreichen und fruchtbaren Böden sind Arten der Gattung *Anabaena* ebenso wie *Azotobacter* zahlreicher vertreten als in weniger fruchtbaren Böden. Ein sehr unfruchtbarer Geestboden enthielt überhaupt keine stickstoffbindenden *Nostocaceen* und kaum *Azotobacter*.

7. Obwohl die symbiontisch in *Azolla* lebende *Anabaena*-Art nicht außerhalb des Wasserfarns kultiviert werden konnte, ließ sich doch beweisen, daß auch diese Alge ebenso wie die frei lebenden Arten den Luftstickstoff bindet und dabei auch von der Gegenwart des Molybdäns abhängig ist.

8. Die Symbiose zwischen *Azolla* und *Anabaena azollae* scheint so eng zu sein, daß diese Alge unter den angewandten Kulturbedingungen außerhalb des Wasserfarns nicht gedeiht.

9. Eine dieser endophytischen *Anabaena* sehr ähnliche und offenbar fast ebenso regelmäßig vorkommende ektophytische Form sowie andere den Azollen äußerlich anhaftende *Nostocaceen* wuchern in molybdänhaltiger, stickstofffreier Nährlösung so stark, daß sie der *Azolla* ihren Lebensraum mit Erfolg streitig machen, sofern keine Kleintiere zugegen sind, die sich von *Nostocaceen* ernähren.

10. In einer synthetischen Nährlösung, die den natürlichen Verhältnissen entsprechend außer Molybdän eine geringe Menge gebundenen Stickstoffs enthält, bindet die *Azolla-Anabaena*-Gemeinschaft mehr Stickstoff als in völlig stickstofffreier Nährlösung.

Literatur.

1) *Allison, Fr. E.* u. *S. R. Hoover*, 3. Intern. Congr. of Soil Sci. **1**, 145—147, 1935. — 2) *Allison, Fr. E.*, *S. R. Hoover* u. *H. J. Morris*, Bot. Gaz. **98**, 433—463, 1937. — 3) *Allison, Fr. E.* u. *H. J. Morris*, 2. Intern. Congr. of Soil Sci. Comm. III, S. 24—28, 1930.

4) *Beijerinck, M. W.*, Centralbl. f. Bakt. II, **7**, 561—582, 1901. — 5) *Bortels, H.*, Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. **56**, 153—160, 1938. — 6) *Derselbe*, Centralbl. f. Bakt. II, **100**, 373—393, 1939.

7) *Drewes, K.*, ebenda II, **76**, 88–101, 1928.

8) *Esmarch, F.*, Hedwigia **55**, 224–273, 1914.

9) *Frank, B.*, Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. **7**, 34–42, 1889.

10) *Geitler, L.* u. *A. Pascher*, Die Süßwasser-Flora Deutschlands, Österreichs und der Schweiz, Heft 12. Jena 1925. – 11) *Gistl, R.*, diese Zeitschr. **4**, 348–378, 1933. – 12) *Glade, R.*, Beitr. z. Biol. d. Pflanzen **12**, 295–346, 1914.

13) *Harder, R.*, Zeitschr. f. Bot. **9**, 145–242, 1917. – 14) *Heinze, B.*, Landw. Jahrb. **35**, 889–910, 1906. – 15) *Huneke, A.*, Beitr. z. Biol. d. Pflanzen **20**, 315–341, 1933.

16) *Maertens, H.*, ebenda **12**, 439–496, 1914. – 17) *Mameli, E.* u. *G. Polacci*, Atti Istit. Bot. Pavia XV, 2, 159–257, 1911. Ref.: Bot. Zentralbl. **117**, II, 427, 1911. – 18) *Menchikovsky, F.*, Repr. Hadar **6**, 4, 1933. Ref.: Mitt. Intern. Bodenk. Ges. **11**, 16, 1936. – 19) *Molisch, H.*, Sci. Rep. Tohoku Imp. Univ., IV. Ser., **1**, 1926. Nach *Drewes* (7).

20) *Oes, A.*, Zeitschr. f. Bot. **5**, 145–163, 1913.

21) *Pirson, A.*, Die Ernährung der Pflanze **36**, 25–31, 1940. – 22) *Pringsheim, E.*, Arch. f. Protistenk. **38**, 126–130, 1918.

23) *v. Schelhorn, M.*, Naturw. u. Landw., Heft 18, 1–54, 1936. – 24) *Schröder, M.*, Centralbl. f. Bakt. II, **85**, 177–212, 1932.

25) *Ter Meulen, H.*, Rec. Trav. Chim. d. Pays-Bas. **51**, 549–550, 1932. – 26) *Derselbe*, Nature **130**, 966, 1932. — 27) *Treub, M.*, Ann. Jardin Bot. Buitenzorg **7**, 213—223, 1888.

28) *Werner, A. P.*, Vortr. Akad. Wissensch. U. d. S. S. R. **4**, 55–58, 1935. Ref.: Centralbl. f. Bakt. II, **97**, 151, 1937. – 29) *Wildemann, L.*, Diss. Münster 1934. – 30) *Wilfahrt, H.* u. *G. Wimmer*, Landw. Versuchsstat. **67**, 27–50, 1907. – 31) *Winter, G.*, Beitr. z. Biol. d. Pflanzen **28**, 295–335, 1935. – 32) *Wunder, W.*, Der Biologe **7**, 209–216, 1938.

(Aus der biologischen Station in Lunz am See und aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Deutschen Karls-Universität in Prag.)

Zur Kenntnis der bakteriellen Sulfatreduktion. I.

Von

Viktor Czurda.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 4. April 1940.)

Bei der Untersuchung der Ernährungsansprüche eigenartiger, aus Ferroverbindungen Ferrieisen fällender Bakterien der *Chromatium Weissei*-Gesellschaft vom Obersee in Lunz am See (Niederdonau) [siehe *Ruttner* (1937)] wie auch bei der Untersuchung anderer Schwefelbakteriengesellschaften wurde eine Mineralsalzlösung mit großen Ferro- und Kohlensäuremengen verwendet. In ihr wurde die im nachfolgenden geschilderte, für die geschaffenen Versuchsbedingungen unerwartete Erscheinung der Sulfatreduktion aufgefunden. Wenn auch die anschließenden Untersuchungen noch nicht alle Einzelheiten aufklären ließen, so rechtfertigen doch die Ergebnisse der qualitativen Bestimmungen eine Mitteilung darüber.

Jeder der im folgenden behandelten Versuche geschah grundsätzlich in drei gleichzeitigen Ausführungen. Darüber hinaus hat jeder Versuch in verschiedenen Zeitabständen mehrfache Wiederholungen erfahren. Die gewonnenen Ergebnisse wurden dann als gesichert angesehen, wenn der Versuch nicht nur in der dreifachen Ausführung, sondern bei jeder der unternommenen Wiederholungen das gleiche qualitative Ergebnis gebracht hat.

Ausgangsversuch.

Der Versuch, welcher den Ausgangspunkt für die folgenden Untersuchungen gebildet hat (Versuch 1) und welcher deshalb als „Ausgangsversuch" bezeichnet werden soll, wird folgendermaßen vorgenommen:

Eine Mineralsalzlösung, bestehend aus 0,01 % NH_4Cl (= 33,6 mg/Liter NH_4), 0,001 % K_2HPO_4, 0,001 % $MgSO_4 + 7 H_2O$ (= 4 mg/Liter SO_4 = 1,4 mg/Liter H_2S), wird nach der Sterilisation mit einem Keimgemisch der genannten Biocoenose beimpft, hernach bis zu 0,1 % mit $(NH_4)_2SO_4 \cdot FeSO_4 + 6 H_2O$ (= 46 mg/Liter NH_4 = 489 mg/Liter SO_4 = 173,4 mg/Liter H_2S) und bis zu 0,2 % mit $NaHCO_3$ versetzt und schließlich nach gründlichem Evakuieren einem CO_2-Druck von rund 100 mm (rund 13 Vol.%) ausgesetzt. Nach wenigen Tagen beginnt in allen mit dem obengenannten Keimgemisch beimpften Lösungen das beim Mischen der Lösungen entstandene, reichliche Eisensediment Schwärzung durch den entstehenden Schwefelwasserstoff zu zeigen.

Bei 22 bis 28° C ist in 6 bis 10 Tagen nicht nur das gesamte Eisensediment in Ferrosulfid umgewandelt, sondern auch das noch in Lösung befindliche Eisen als Sulfidüberzug an den Gefäßwänden ausgefällt. Bloß am Meniskus bleibt zunächst eine Ferrihydroxydhaut erhalten. Sie verschwindet erst, wenn sich auch im Gasraum eine gewisse H_2S-Menge angesammelt hat und eben mit Bleiacetatpapier nachweisbar wird. Die gebildete Schwefelwasserstoffmenge ist demnach eine beträchtliche.

Im Liter dieser Kulturlösung könnten theoretisch 1,4 + 173,4 mg H_2S entstehen. Rund die Hälfte hiervon kann als FeS (224 mg) gebunden werden. Schon während der Bildung wird ein Teil des Schwefelwasserstoffs in der Lösung neben dem FeS und im Gasraum verteilt bleiben. Nach 12 Tage langer Kulturdauer ist kein Eisen in der Kulturlösung mehr kolorimetrisch nachweisbar. Es ist als FeS ausgefällt.

Der Versuch führt zum gleichen Ergebnis, wenn das reduzierende Keimgemisch der ersten Passage nach 12 bis 30 Tagen in weiteren Passagen durch Überimpfen eines oder zweier Tropfen fortgeführt wird. Die Reduktionsfähigkeit, welche in der zweiten und dritten Passage deutlich zunimmt, bleibt auch nach 17 Passagen in dieser Lösung erhalten. Vermutlich infolge der Anreicherung der Keime setzt sie von der zweiten Passage an bereits in der halben Zeit ein.

In den gleichzeitig und gleichartig vorbereiteten, also sterilisierten, aber unbeimpft bleibenden Röhrchen, die stets zur Kontrolle im gleichen Versuchsraum untergebracht werden (Versuch 2), unterbleibt die Erscheinung. Es liegt im vorigen also eine biologische Umsetzung vor. Der Eintritt der Sulfatreduktion unterbleibt ebenfalls, wenn die sterile Lösung mit anderen Keimgemischen, unter anderen mit solchen der Luft beimpft wird (Versuch 3a). Sie unterbleibt schließlich, wenn die unsterile Versuchslösung in unsterilen Röhrchen untergebracht den oben genannten übrigen Versuchsbedingungen ausgesetzt wird (Versuch 3b).

Anfänglich wurden bei jeder Vornahme des Ausgangsversuchs je drei Röhrchen als Kontrolle unbeimpft, sonst aber völlig gleich behandelt, im Versuchsraum (Exsikkator) untergebracht. Im Laufe der bisherigen Untersuchungen sind 26 Kulturen des Versuchs 2 und 79 Kontrollversuche mit nicht sterilisierter und unbeimpft gebliebener Lösung (Versuch 3b) durchgeführt worden. In allen etwa 100 Kontrollen ist ausnahmslos die Sulfatreduktion ausgeblieben. Die Beobachtungsdauer betrug wenigstens 28 Tage. In einigen Fällen waren die Röhrchen bis zu 1 Jahr ohne jedes Anzeichen eines Reduktionsbeginns stehengeblieben. Demnach fehlen die Erreger der Reduktion im Luftkeimgemisch der Stadt und des freien Landes, oder sie treten darin so vereinzelt auf, daß sie diesem Nachweisverfahren entgehen.

In Anbetracht des unerwarteten Ergebnisses des „Ausgangsversuchs" und seiner vielen Ausführungen (etwa 220 Einzelversuche) seien zu seiner besseren Beurteilung noch folgende Einzelheiten der Durchführung, welche stets streng eingehalten wurde, wenn nichts Anderes vermerkt ist, zum oben Gesagten hinzugefügt.

Die mit einfach oder doppelt destilliertem Wasser bereitete Nährsalzlösung, die mit Rücksicht auf die später eintretende Verdünnung durch Zusätze eine um 20 % höhere Salzmenge erhält als oben angegeben ist, wird zu 8 ccm in Röhrchen aus Jenaer Glas (16 × 160 mm) abgefüllt. Die zum Versuch bestimmten Röhrchen und Kolben werden mit verdünnter Salzsäure aufgekocht und mechanisch gereinigt. Sie sind restlos benetzbar.

Die Lösung wird hierauf, zuvor in üblicher Weise entkeimt, mittels einer Öse mit einem Tropfen des geeigneten Keimgemisches beimpft. Dann wird in jedes Röhrchen 1 ccm einer mittels Seitzfilter entkeimten 1 %igen Ferroammoniumsulfatlösung und 1 ccm einer 2,1 %igen, unter dem Kipp mit Kohlensäure gesättigten $NaHCO_3$-Lösung zugefügt, deren Bereitung und Entkeimung nach dem Vorgang von *Roelofsen* (1933) geschieht. Durch den Bicarbonatzusatz tritt zur Ferrihydroxydfällung noch die Ferricarbonatfällung als eine braune, milchige Trübung, die sich während der ersten 24 Stunden allmählich als Bodenkörper sammelt. Die soweit vorbereiteten Röhrchen werden in dicht schließenden Exsikkatoren oder anderen geeigneten Gefäßen zu 10 oder mehr Stück untergebracht und ihr Inhalt durch Auspumpen der Luft durch 3 bis 4 Minuten zum Sieden gebracht. Schließlich wird bis zu einem Druck von 100 mm Hg vom Sauerstoff nicht gereinigte Kippkohlensäure durch eine Waschflasche mit Wasser eingeleitet und der übrige Unterdruck belassen. Die Dichtung der Exsikkatoren muß dabei sorgfältig geprüft werden, ob sie den belassenen Unterdruck hinreichend lange erhalten läßt. Die Kohlensäure wird aus Marmor und Schwefelsäure oder Salzsäure im Kipp gewonnen. Der zum Anzeigen der c_H in einzelnen Röhrchen zugesetzte Indikator (Bromthymolblau) läßt erkennen, daß nach einigen Tagen, nach Eintritt des Gleichgewichts zwischen den eingeschlossenen Lösungen und der sie umgebenden Atmosphäre, ihre Reaktion von p_H 7,6 bis 8,1 auf 6,85 bis 7,0 verschoben wird.

Die Reduktion des Sulfats tritt übrigens in dieser Lösung auch ein, wenn größere Flüssigkeitsmengen in Erlenmeyerkölbchen (bis zu 0,5 Liter) angewendet werden.

Verlauf der Ferrosulfidabscheidung.

Die Abscheidung von Ferrosulfid beginnt mit der Entstehung von schwarzen Flecken im Innern des Sediments, die sich verbreitern und allmählich das ganze Sediment erfassen. In 6 bis 10 Tage alten Kulturen, deren fahlgelbes Eisensediment bereits völlig schwarz geworden ist, geht die Abscheidung von FeS auf Kosten des noch gelösten Eisens fort (s. Abb. 1a). Nicht nur am Grunde, sondern aufsteigend auch an den Vertikalwänden der Röhrchen wird andauernd Sulfid abgeschieden. Die Abscheidung an den Wänden tritt anfangs als eine wechselnde Menge verstreuter kleiner schwarzer Punkte auf, welche an Schwärzungsgrad und an Größe zunehmen. Dazwischen entstehen fortlaufend neue

Fe S-Bildungsherde, bis ein dichter, bisweilen undurchdringlicher schwarzer Belag an den Meniskus der Lösung heranreicht. Jeder der anfangs entstehenden Punkte stellt eine aus festgesetzten Keimen bestehende Kolonie dar, von der aus die H_2S-Abscheidung und damit die Ausbreitung des Fe S-Niederschlags vor sich geht. Wie schon erwähnt

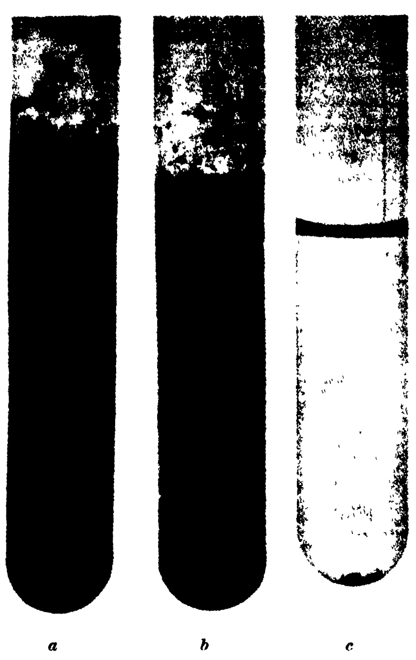


Abb. 1. Röhrchen *a* und *b* zeigen den Zustand der Kulturen des Ausgangsversuches und seiner Kontrolle (Versuch 1) am 13. Versuchstag. Das Röhrchen *a* ist beimpft, das Röhrchen *b* ist nicht beimpft worden. In *a* ist das gesamte Eisen (143 mg/Liter Fe) als Bodenkörper (vom Versuchsbeginn an) und als Wandbelag (während der Umsetzung) in Form von Fe S ausgefällt worden. Gelöstes Eisen ist in der Kulturlösung zur Zeit der Aufnahme kolorimetrisch nicht mehr nachweisbar. Vom gebotenen Sulfat (493 mg/Liter SO_4) sind mehr als 75% reduziert. — Sechs solcher Kulturen haben an den Gasraum des Anaerobenapparates mit einem Fassungsraum von 2,5 Liter soviel H_2S abgegeben, daß die zur Kontrolle mit eingeschlossenen sechs unbeimpft gebliebenen Röhrchen durch den von oben eindringenden H_2S eine weitgehende Fe S-Bildung von obenher mitmachen (Röhrchen *b*). Das Sediment am Grunde dieser Röhrchen ist im Gegensatz zu den beimpften Versuchsröhrchen braun. — Das Röhrchen *c* ist eines von sechs, die im gleichen Anaerobenapparat eingeschlossen waren und die eine beimpfte Versuchslösung gleicher Zusammensetzung, jedoch ohne $NaHCO_3$-Zusatz enthalten und somit nahezu das gesamte Eisen infolge höherer Azidität (p_H 5,1, 100 mm Hg-Druck CO_2) gelöst aufweisen. In diesen ist nicht nur die eigene bakterielle, sondern auch die auf Kosten diffundierender H_2S vor sich gehende Fe S-Bildung unterbunden. Aufnahme im durchfallenden Licht.

wurde, geht die H_2S-Bildung über jene Menge hinaus, welche durch das vorhandene Eisen gebunden werden kann. Gewisse Mengen davon werden an den Gasraum (von 3 bis 10 Liter) selbst durch dichte Wattestöpsel bald abgegeben, so daß neben den Röhrchen eingeschlossenes Bleiacetatpapier, noch ehe das ganze gelöste Eisen als Fe S gefällt ist, gebräunt oder geschwärzt wird. Selbst in großen Gasräumen sammelt

sich soviel H_2S an, daß er auch in unbeimpft gebliebenen Röhrchen durch die Wattestöpsel hindurch von obenher FeS-Bildung bewirkt (siehe Abb. 1b). Nach dieser weitgehenden Sulfatreduktion ist in der Lösung Eisen kolorimetrisch nur mehr in Spuren nachweisbar.

Über die Gärungserreger.

An der freien Oberfläche der Versuchslösung sammeln sich nach 10 Tagen Keime zu einer weißlichen, zähschleimigen Schicht, die anfangs von $Fe(OH)_3$, später von FeS verschieden stark durchsetzt ist. Die Lösung selbst erweist sich nach dem Abkratzen des brüchigen FeS-Niederschlags leicht trübe. Sie nimmt, an die Luft gebracht, rasch infolge der einsetzenden Fällung von $Fe(OH)_3$ an Trübung zu. Das nach mehrmaligem Überimpfen zur Ausbildung gelangende Oberflächenhäutchen besteht aus zahlreichen, in Schleim dicht liegenden Stäbchen. Dazwischen sind kurze Spirillen vereinzelt eingestreut. Auch vereinzelte dicke Spirillen mit den auch bei anderen Vertretern der Gattung auffindbaren Tröpfchen kommen vor.

Am Grunde, im Eisensulfidsediment, scheinen Stäbchen völlig zu fehlen. Es finden sich ausschließlich Spirillen von einem Schraubenumgang und ovalen Zellquerschnitt und lebhafter Bewegung vor. Die FeS-Krümelchen sind von ihnen dicht besetzt und umschwärmt. Im üblichen Hängetropfenpräparat an der Luft sammeln sich die umherschwärmenden Zellen chemotaktisch um die Eisensulfidkrümelchen. Schon aus dem Vorkommen und Verteilung in der Versuchslösung kann geschlossen werden, daß die Spirillen die eigentlichen Urheber der Sulfatreduktion sind und daß die Stäbchen Begleitorganismen darstellen. Bei der Trennung der beiden Organismen im Hochschicht- oder Plattenguß erweisen sich nur die Spirillen als die H_2S-Bildner. Die Stäbchen sind dazu nicht befähigt.

Werden Kulturen mit H_2S-Abscheidung unmittelbar nach der Herausnahme aus dem Versuchsraum mit einer etwa 1 cm hohen Paraffinschicht (Schmelzpunkt 40 bis 42° C) gegen Luft abgeschlossen (Versuch 4), so bleibt die Reduktionsfähigkeit der Keime solcher Kulturen bis zu 18 Monaten und mehr erhalten. Auch dann sogar, wenn in dieser langen Zeit der Paraffinverschluß undicht wird und die Reaktion infolge des CO_2Verlustes über p_H 8,0 hinaus verschoben worden ist und O_2 eindringt. Bereits *Starkey* (1938) hat an *Sporovibrio desulfuricans* solche Erfahrungen der Langlebigkeit der Keime gemacht.

Über das natürliche Vorkommen dieser Keime.

Die geschilderten sulfatreduzierenden Keime finden sich, wie mir schon aus den Untersuchungen früherer Jahre bekannt war, als Begleitkeime von *Chromatium Weissei* im Lunzer Obersee in einer Tiefe von

10 bis 11 m. Sie waren in den sogenannten Doppelschichtkulturen (siehe *Czurda*, 1936) ausgeführt mit einem sehr ähnlich zusammengesetzten Agarnährboden bei Einsaat der Chromatien nach 14 bis 21 Tagen zu FeS-fällenden Kolonien herangewachsen (Versuch 5).

Unter Doppelschichtkultur ist die Kulturausführung zu verstehen, bei der das besäte und in stehendem Röhrchen rasch zum Erstarren gebrachte Nährsubstrat („Kulturschicht") von dem gleichen, aber unbeimpft bleibenden Nährsubstrat überschichtet wird. Die „Deckschicht" wird ebenfalls rasch erstarren gelassen. Um den CO_2-Verlust des Substrats und ein Eindringen des O_2 namentlich beim Natriumsulfidzusatz zu verhindern, wird Paraffin (Schmelzpunkt 40 bis 42° C) zu einer Schicht von rund 1 cm Höhe aufgegossen. Beim Erstarren vielleicht entstehende Undichtigkeiten werden durch ein gelindes Auftauen des Paraffinpfropfes beseitigt.

Auffallend war damals die zu gewissen Jahreszeiten regelmäßige Häufigkeit der aus einem bestimmten Volumen des Standortswassers zur Entwicklung gelangter Kolonien, die auf Grund der damaligen Erfahrungen dem *Sporovibrio* (*Microspira*) *desulfuricans* (*Beij.*) *Starkey* (siehe *Starkey*, 1938) zugeschrieben wurden. Die Zahl der zur Entwicklung gelangter Kolonien bewegte sich in den Sommermonaten 1936 bis 1938 (Juli bis August) zwischen 400 bis 600 je 1 ccm Standortswasser. Gezählt sind damit natürlich nur jene sulfatreduzierenden Keime und Keimklumpen, die sich in der beschriebenen Nährlösung entwickelt haben, von der allerdings nicht bekannt ist ob sie so günstige Entwicklungsbedingungen schafft, daß sich alle zu dieser physiologischen Gruppe gehörenden Keime zu erkennbaren Kolonien vermehrt haben.

Schon nach dem Vorliegen der ersten Ergebnisse des Ausgangsversuchs wurde es aber klar, daß die im Agar zur Entwicklung gelangten Keime nicht völlig mit *Sporovibrio* (*Microspira*) *desulfuricans* übereinstimmen. Ist doch mit dem Versuch 1 gezeigt, daß der Prozeß auch ohne Zusatz von organischen Stoffen möglich ist. Übrigens soll nicht unerwähnt sein, daß diese Keime wiederholt mit den von *van Delden* (1904) und *Baars* (1930) angegebenen Nährböden in Hochschicht und bei langer Versuchszeit nicht nachgewiesen werden konnten. Nach den derzeitigen Kenntnissen (s. S. 195) hat dies seinen Grund in dem CO_2-Mangel des Nährbodens.

Die mit dem Versuch 1 anreicherbaren und angereicherten Sulfatreduzierer der *Chromatium*-Gesellschaft wechseln ihre Häufigkeit im Laufe eines Jahres sehr stark, was offenkundig mit der jahreszeitlichen Wasserzirkulation des Sees in Zusammenhang steht (über diese siehe *Ruttner*, 1933, 1937, *Müller*, 1938). Außerhalb der eben angegebenen Jahreszeit war die Keimzahl in der angegebenen Tiefe so gering, daß sie mit dem Doppelschichtverfahren nicht mehr direkt nachgewiesen werden konnten. Vielfach blieben auch die Anreicherungsversuche, nach Art des Ausgangsversuchs vorgenommen, ergebnislos.

Eine beträchtliche Anreicherung gestatten auch die Versuchslösungen, die mit $NaHCO_3$ und Na_2S versehen (ohne die großen Eisenmengen) für die Kultur von schwefelführenden *Purpurbakterien* verwendet werden (*van Niel*, 1931, *Czurda*, 1935).

Über die sonstige Verbreitung der Biocoenose und ihrer einzelnen Komponenten in der Natur und über den Vergleich der vorliegenden Befunde mit den Ergebnissen von *Klein* und *Steiner* (1929) am Lunzer Untersee und mit den jüngsten ökologischen Beobachtungen anderer wird erst im Zusammenhang mit der Keimanalyse berichtet werden.

Grundversuch.

Im weiteren wurde geprüft, ob eine Sulfatreduktion auch dann eintritt, wenn an Stelle von 0,1 % Ferroammoniumsulfat 0,1 % des sekundären Natriumsulfats ($Na_2SO_4 \cdot 10\,H_2O$ = 298 mg/Liter SO_4 = 105 mg/Liter H_2S), also vereinfachte Bedingungen, geboten werden (Versuch 6), alles andere aber an der Versuchsanordnung beibehalten wird. Da das in Form von 0,00001 % $FeCl_3$ eingetragene Eisen, das übrigens als Nährelement nicht gesondert zugesetzt werden muß (Jenaer Glas!), als Indikator für Schwefelwasserstoff nicht ausreichend sein konnte, wurde zur Sichtbarmachung des H_2S jedes Röhrchen mit Watte verschlossen und dabei ein Bleiacetatpapierstreifen mit in das Röhrchen eingeklemmt.

An der bei p_H von 7,0 schon am 5. und 6. Tag einsetzenden Bräunung des Papiers ist die H_2S-Abgabe der Versuchslösung erkennbar. In weiteren 2 bis 5 Tagen ist das Bleiacetatpapier völlig geschwärzt und eine beträchtliche Diffusion des H_2S durch den Wattestöpsel in den Gasraum nachweisbar.

Auch in dieser Versuchslösung können die Passagen ohne Zusatz von H-Spendern beliebig lange ohne Einbuße an Geschwindigkeit und Intensität der Reduktion fortgesetzt werden. Auch die Sicherheit des Eintritts der Erscheinung ist hier ebenso groß wie im Ausgangsversuch. Von 181 Röhrchen in 14 Passagen haben ausnahmslos alle am 6. bis 8. Tage das im Röhrchen befindliche Indikatorpapier geschwärzt, 38 mit sulfatreduzierenden Keimgemischen nicht beimpfte, in den gleichen Exsikkatoren befindliche, der Kontrolle dienende Röhrchen (Versuch 7) blieben trotz längerer Beobachtungszeit ohne jedes Anzeichen einer H_2S-Bildung.

Die meist stärkere Trübung im Vergleich zum Ausgangsversuch zeigt im wesentlichen die gleiche Zusammensetzung, wie sie oben geschildert worden ist. Die starke Entwicklung der Oberflächenhaut fällt besonders auf.

Das Ergebnis des Grundversuchs zeigt, daß das zur Einstellung des Redoxpotentials und als Indikator für entstehenden H_2S zugesetzte Eisen für den Eintritt und das Stattfinden des Prozesses gar nicht notwendig ist.

Durch das Ergebnis der beiden Versuche (Versuche 1 und 6) ist das Vorliegen eines nach den bisherigen Erfahrungen über Sulfatreduktion unerwarteten Prozesses aufgezeigt. Denn nach den Untersuchungen von *Beijerinck* (1895), *van Delden* (1904), *Elion* (1924), *Rubentschik* (1928) und vor allem aber die von *Baars* (1930) verlangt die Sulfatreduktion zu ihrem Ablauf geeignete organische Substanzen (Alkohole, Zucker, Fettsäuren), welche die notwendigen Wasserstoff- und Energiequelle nach dem Formelbild

$$4\,H_2A + H_2SO_4 \rightarrow 4\,A + H_2S + 4\,H_2O$$

darstellen. In diesem Formelbild bedeutet H_2A die als Wasserstoffspender dienende organische Substanz. Auf Grund der Untersuchungen von *Stephenson* und *Stickland* (1931) kann, wie schon *Niklewski* (1914) vermutet hat, als Wasserstoffspender auch der molekulare Wasserstoff selbst treten, so daß die in allgemeinster Form ausgedrückte Reaktionsgleichung in den nachstehenden Sonderfall

$$4\,H_2 + H_2SO_4 \rightarrow H_2S + 4\,H_2O$$

übergeht, wie dies nach der Theorie von *Kluyver* (1931) zu erwarten ist (*Bunker*, 1936).

Die Unwahrscheinlichkeit des vorliegenden Falles von Sulfatreduktion besteht darin, daß die Lösungen meiner Versuche keine Zusätze an irgendwelchen organischen Stoffen oder molekularen Wasserstoff erhalten oder enthalten, die als H-Donatoren dienen würden, soweit man dies nach dem bisher Gesagten beurteilen kann. Diese Tatsachen fordern zu einer gründlicheren Untersuchung der Erscheinung heraus.

Über die allgemeinen Bedingungen der Sulfatreduktion.

Die Wirkung der Außenbedingungen wurde durch Abänderung der beiden Versuchsanordnungen (Versuche 1 und 6) zu bestimmen gesucht.

Den Einzelheiten sei zunächst folgendes vorangestellt: Die anfangs und später an der biologischen Station in Lunz am See ausgeführten Versuche wurden in Prag (1938 und 1939) wiederholt, wo andere Gefäße (Exsikkatoren, Röhrchen), anderes Dichtungsfett (*Kahlbaum*sches Hahnfett, Kautschuk-Kolophonium-Vaseline-Kitt), andere Nährsalzpräparate (*Merck*), ein anderes Wasser, nämlich ein durch Quarzkühler über eine Tropfenfängereinrichtung (*Fitting-Mevius*) hergestelltes und doppeltdestilliertes Wasser und eine andere Kippkohlensäure verwendet worden ist. Dabei wurde die gleiche Ergebnissicherheit aller Versuche

festgestellt wie in Lunz. Es handelt sich also nicht um eine an bestimmte Apparaturen oder Versuchsumstände gebundene Erscheinung.

1. Für den Eintritt der H_2S-Bildung durch das vorliegende Bakteriengemisch ist die *Anwesenheit der Kohlensäure* unentbehrlich. Dies ist ein auffallender Unterschied gegenüber den bisher bekannten Prozessen. Wird nämlich bei der Ausführung des Ausgangs- sowie des Grundversuchs das Natriumbicarbonat und die Kohlensäure fortgelassen (Versuche 8 und 9), so unterbleibt die Erscheinung. Sie erfolgt auch dann nicht, wenn zwecks Ersatzes der Pufferwirkung des $NaHCO_3$–CO_2-Systems das Phosphatpuffergemisch mit der entsprechenden Reaktion von p_H 7,0 in Konzentrationen von 0,1, 0,05 oder 0,01 Mol/Liter zugesetzt wird (Versuche 10, 11 und 12). Da die Phosphatzusätze den Eintritt und den normalen Verlauf der Reduktion an sich nicht hindern oder verzögern, wie vermutet werden könnte, wenn gleichzeitig CO_2 zugesetzt wird (Versuche 13, 14 und 15), so erscheint hiermit die Notwendigkeit der Anwesenheit von CO_2 erwiesen zu sein.

2. Das *Licht* hat, nach den bisherigen Versuchen, keinen erkennbaren Einfluß auf das Stattfinden des Prozesses. Er tritt mit gleicher Geschwindigkeit und anscheinend auch mit dem gleichen Endergebnis im Dunkeln wie im Licht ein (Versuche 16 und 17).

3. Soweit es die qualitativen Versuche erkennen lassen, liegt das *Temperaturoptimum* über 28° C. Der Prozeß geht, allerdings sehr verlangsamt, auch noch bei einer Temperatur von 4 bis 5° C vor sich. Dies ist übrigens die Temperatur, bei welcher die Keime am Fundort, in der Tiefe von 10 bis 11 m, vorkommen und H_2S bilden (Versuche 18, 19 und 20).

4. In den beiden Versuchsanordnungen geht die Sulfatreduktion bei einer *Reaktion* von p_H 6,85 bis 7,0 vor sich. Infolge der ausgiebigen Pufferung (0,21 % $NaHCO_3$ und CO_2-Vorrat) bleibt sie bis zum Versuchsende unverändert, mag dabei eine sehr intensive oder unmerkliche Umsetzung stattfinden.

Um den Einfluß einer anderen Reaktion zu prüfen, wurde in dem Kohlensäure-Bicarbonatsystem an Stelle des Natriumsalzes das Calciumsalz eingeführt. Eine sterile $CaCO_3$-Aufschwemmung in doppeltdestilliertem Wasser wird durch einige Tage mit CO_2 gesättigt, indem ein Kohlensäurestrom immer wieder durch sie geleitet und die Lösung zwischendurch unter dem Gasvorrat des Kipp aufbewahrt wird. Von dieser Vorratslösung wird wie von der Natriumbicarbonatlösung je 1 ccm zur Versuchslösung in den Röhrchen (9 ccm) hinzugefügt. Der Versuchslösung werden demnach nur 10 % der Salzmenge zugeführt, die sich unter einer CO_2-Atmosphäre löst. Die für den Versuch fertige Lösung nimmt unter dem CO_2-Druck von 11 bis 13 % (Volumen), wie er üblicherweise eingerichtet wird, eine Reaktion von p_H 5,6 an.

Wird die $Ca(HCO_3)_2-CO_2$-Lösung in Verbindung mit dem Ausgangsversuch (Versuch 21) angewendet, so kommt es infolge der höheren Azidität nur zu einer bescheidenen Eisenfällung bei dem Zusammenmischen der Lösungen. Auch in diesem Versuch erfolgt später Schwefelwasserstoffbildung. Infolge der höheren Azidität kommt es zu einer früheren Abgabe des H_2S an den Gasraum und damit naturgemäß zu einem früheren Nachweis mittels des Bleiacetatpapiers. Allmählich kann auch hier eine wenn auch mäßige FeS-Fällung am Grund der Röhrchen einsetzen.

In Verbindung mit dem Natriumsulfat (Grundversuch) (Versuch 22) ist an der Verfärbung des Indikatorpapieres die gleiche Beschleunigung des Eintritts der H_2S-Abgabe an den Gasraum zu sehen wie im Ausgangsversuch. Der Begleitorganismus (Stäbchen) tritt in diesen Kulturen kaum sichtbar in Erscheinung.

Werden durch Verwendung von Gemischen der beiden Bicarbonatvorratslösungen Zwischenwerte der Reaktion (z. B. p_H 6,35) im Versuch eingerichtet (Versuch 23), so merkt man, daß mit der Annäherung des p_H-Wertes an 7,0 eine Zunahme der schließlich gebildeten FeS-Menge eintritt. Genauere Beziehungen werden erst quantitative Versuche ergeben. Bei Verwendung des $NaHCO_3$ gelingt die Einrichtung von p_H-Werten über p_H 7,0 nur durch Herabsetzung der CO_2-Tension. Wird die Versuchslösung nach dem üblichen Zusatz von $NaHCO_3$ (s. Ausgangsversuch) nicht einem auf 0 verminderten Luft- und einem stark erhöhten CO_2-Druck ausgesetzt, sondern sogleich mit Paraffin gegen Luft abgeschlossen (Versuch 24), so zeigt die Lösung je nach der Größe des CO_2-Verlustes während der Zubereitung eine Anfangsreaktion von p_H 7,6 bis 8,1. Auch in solchen Versuchen kommt es zu einem, wenn auch sehr verlangsamten und herabgesetzten Sulfatabbau. Soweit zur qualitativen Bestimmung durchgeführte Versuche Rückschlüsse zulassen, liegt somit die optimale c_H um p_H 7,0. Die letztgenannte Versuchsanordnung (Versuch 24) läßt allerdings nicht erkennen, ob nicht vielleicht der herabgesetzte CO_2-Druck oder die stark geschwächte Pufferungsfähigkeit der Lösung die Ursache für die Verringerung des Umsatzes ist.

5. Eine weitere Voraussetzung für den Eintritt der Erscheinung ist das *Fehlen des molekularen Sauerstoffs*. Wird im Ausgangs- oder Grundversuch die Luft und damit der Luftsauerstoff nicht durch gründliches Evakuieren des Versuchsraumes beseitigt, so unterbleibt bei sonst beibehaltener Versuchsanordnung der Eintritt der Reduktion. Das gilt vor allem vom Grundversuch, der keine reduzierenden Zusätze erhält. Wie das nach den Erfahrungen von *Sporovibrio* (*Microspira*) *desulfuricans* notwendige Redoxpotential zu Versuchsbeginn erreicht wird, ist augenblicklich nicht klar. Es schien, daß das Potential durch die in der Impfflüssigkeit enthaltene Menge an H_2S und Sulfiden herbei-

geführt wird. Die von *Baars* gemachten guten Erfahrungen mit einem anfänglich geringen Sulfidzusatz sind in meinem Falle nach dem Bisherigen jedoch bedeutungslos. Das Natriumsulfid wurde dabei in Form eines Tropfens (0,05 bis 0,03 ccm) einer 0,021- bis 0,21 %igen Lösung zugeführt. Im Ausgangsversuch scheint die zugesetzte Eisenlösung (Ferro) für die Schaffung der notwendigen Eintrittsbedingungen (s. bereits *Elion*, 1925) zu sorgen.

Besondere Bedingungen der Sulfatreduktion: Der beteiligte Wasserstoffspender.

Das Stattfinden der Sulfatreduktion setzt das Vorhandensein eines geeigneten Energie- und Wasserstoffspenders voraus. Einer der bekannten Wasserstoffspender wird der Versuchslösung nicht zugesetzt und ein solcher ist unter den genannten Lösungsbestandteilen als Beimengung ohne nähere Untersuchung nicht zu erkennen. Es kommen in Frage: 1. organische Stoffe, 2. molekularer Wasserstoff und 3. das zugesetzte Ammoniumsalz.

1. Die Mitwirkung *organischer Stoffe* kann aus folgenden Gründen nicht in Frage kommen:

Solche werden bei der Bereitung der Lösungen nicht nur nicht zugesetzt, sondern solche werden infolge der Verwendung von doppeltdestilliertem Wasser, von „pro analysi"-Präparaten auch unbewußt nicht den Lösungen zugeführt. Die darüber hinaus noch denkbaren Verunreinigungen durch solche Stoffe kommen schon mengenmäßig nicht als entscheidende Faktoren in Betracht. Wollte man annehmen, daß mit der Einimpfung des Tropfens Standortswassers organische Stoffe mit eingeführt werden, so kann ihre Menge keinesfalls für die beobachteten Sulfidmengen ausreichend sein. Sie müßte außerdem bald verbraucht sein und könnte nicht durch viele Passagen im Ausgangs- und Grundversuch den Prozeß aufrechterhalten.

Es ist ferner an das Vorkommen flüchtiger organischer Stoffe zu denken, welche das Vakuumfett, mit dem die Schliffe gedichtet sind, verdampfen läßt (s. oben). Abgesehen davon, daß ihre Menge zu gering erscheint, läßt der Versuch 24, in dem die Mitwirkung eines Dichtungsfettes fortfällt, erkennen, daß auch dann eine Reduktion eintritt. Daß nicht etwa auch aus dem Paraffin flüchtige Stoffe (Grenzkohlenwasserstoffe) beteiligt sind, ergibt der Versuch mit Keimeinsaat in hoher Agarschicht unter Paraffinverschluß, in der die Keime unten sowie oben, in unmittelbarer Nähe des Paraffins, in gleicher Stärke FeS bilden.

Bei Verwendung von Wattestöpseln könnte daran gedacht werden, daß ein Cellulose abbauendes Begleitbakterium auf Kosten der in die Lösung fallenden Faserbruchstücke den notwendigen H-Spender

liefere. Diese Möglichkeit entfällt, weil die Sulfatreduktion auch bei Verwendung von Glaskappenverschlüssen ungehemmt eintritt und abläuft. Solche Verschlüsse wurden anfangs durch viele Versuchsreihen hindurch verwendet. Erst später sind die Watteverschlüsse eingeführt worden.

2. Als Wasserstoff- und Energiespender kommt der *molekulare Wasserstoff* in Betracht, von dem *Stephenson* und *Stickland* gezeigt haben, daß er organische Stoffe vollkommen ersetzen kann. Ein Wasserstoff könnte in den bisherigen Versuchen insofern vielleicht vorkommen, als ein solcher im Kipp aus erzhaltigem Marmor neben CO_2 in gewissen Mengen entstehen könnte. Diese Möglichkeit wurde allerdings seitens der Chemiker als gänzlich unwahrscheinlich hingestellt.

Zwecks Entscheidung, ob dies in meinem Falle nicht doch zutrifft, wurde die zur Füllung des Exsikkators notwendige Menge von CO_2 aus dem Kipp langsam durch Schwefelsäure und durch ein mit glühendem Kupferoxyd gefülltes Verbrennungsrohr eingeleitet (Versuch 25a und 25b). Eingeschlossen waren in diesem Exsikkator sowie in den dazugehörigen Kontrollexsikkatoren der Ausgangs- und Grundversuch, beide in mehreren Ausführungen. Zur Kontrolle wurde in einem zweiten Exsikkator aus der gleichen Kippfüllung bezogene, aber nicht gereinigte CO_2 untergebracht (Versuch 26a und 26b). Zur Auffüllung eines dritten Exikkators wurde gereinigte CO_2 (100 mm Hg) mit Wasserstoff (50 mm Hg) benutzt (Versuch 27a und 27b). Ein vierter Exsikkator erhielt als Füllgas nur 100 mm Hg Wasserstoff (Versuch 28a und 28b). Die im letzten Exsikkator untergebrachten Kulturen blieben ohne Bicarbonatzusatz, um nicht eine zu alkalische Reaktion durch die CO_2-Abgabe der Kulturlösung zu verursachen. Der verwendete Wasserstoff ist in einem Kipp mit *Merck*schem Zink und reinster Schwefelsäure erzeugt und daraus zwecks Reinigung durch eine Silbernitratlösung entnommen worden.

Auch in den Versuchen 25 bis 28 wurden neben den Versuchsröhrchen solche ohne Beimpfung mit eingeschlossen. Nach 10 Tagen war in allen beimpften Röhrchen der Versuche 25, 26 und 27 mit Eisenammoniumsulfat (a) das Sediment tiefschwarz verfärbt. In allen Röhrchen mit Natriumsulfat der genannten Versuche 25 bis 27 (b) war das Bleiacetatpapier tiefbraun bis schwarz verfärbt. In den gleichzeitig mit untergebrachten unbeimpften Röhrchen war weder im ersten Falle noch im zweiten eine Veränderung zu sehen. Der vierte Exsikkator (Versuch 28) zeigte nach dieser Zeit an den beimpften Röhrchen mit Ferroammonium- (a) bzw. Natriumsulfat (b) nur eine schwach ausgeprägte Veränderung. Trotz beträchtlich verlängerter Versuchszeit ist der Unterschied nicht verwischt worden.

Aus dem Verhalten der beimpften Röhrchen der Versuche 25 bis 27 darf geschlossen werden, daß nicht der etwa als Beimengung der Kippkohlensäure vorhandene Wasserstoff die Reduktion bewirkt. Wenn im Versuch 28a und 28b die Füllung mit Wasserstoff eine deutliche Verminderung hervorgerufen hat, so kann dies zwei Ursachen haben: Es kann die in den Lösungen und im Wasserstoffgas enthaltene Kohlensäure nicht ausgereicht haben oder es haben schädliche Beimengungen des Wasserstoffgases hemmend gewirkt oder aber es hat die Förderung irgendwelcher wasserstoffvergärenden Bakterien den Reduktionsprozeß ungünstig beeinflußt. Nach verschiedenen vorliegenden Erfahrungen hat die zweite der genannten Möglichkeiten die größte Wahrscheinlichkeit.

Um die Frage, ob nicht molekularer Wasserstoff die Rolle des Wasserstoffspenders spielt, noch sicherer zu entscheiden, wurde in weiteren Versuchen eine Kohlensäure verwendet, welche aus reinster Soda (pro analysi, *Merck*) und reinster Schwefelsäure (pro analysi, *Merck*) im Gasentwicklungsapparat entwickelt worden war (Versuch 29a und 29b). Dieser Versuch hatte das gleiche Ergebnis wie die bisherigen Grund- und Ausgangsversuche und wie die gleichzeitig vorgenommenen Kontrollversuche mit der gewöhnlichen Kippkohlensäure.

Übrigens hatte schon der Versuch 24, in welchem die Kulturlösung nach dem Zusatz des Bicarbonats mit Paraffin abgeschlossen worden ist, gezeigt, daß eine Mitwirkung des molekularen Wasserstoffs nicht in Betracht kommt.

Auch der Beginn der FeS-Bildung im Ausgangsversuch (s. S. 189) aus dem Innern des Ferriniederschlags und das allmähliche Aufsteigen des Prozesses im Sediment und der darüber befindlichen Lösung spricht dafür, daß der H-Spender nicht aus der Atmosphäre in die Versuchslösung eindringt, sondern im Sediment selbst zu suchen ist.

Wollte man annehmen, daß der erforderliche Wasserstoff erst in der Kulturlösung durch die Tätigkeit von Begleitbakterien entstehe, so stößt dieser Versuch auf die Schwierigkeit, daß für die Bildung von Wasserstoff oder einer H-spendenden organischen Substanz in der Kulturlösung keine hierzu erforderlichen Energiequellen bzw. Ausgangssubstanzen vorliegen. Wird nun unter den der Versuchslösung zugesetzten Mineralsalzen Umschau gehalten, welches von ihnen etwa in Frage kommen könnte, so ergibt sich eine Möglichkeit nur für das Ammoniumsalz [NH_4Cl und $(NH_4)_2SO_4$].

3. Da eine Veränderung der *Ammoniumsalzkonzentration* von 0,01 auf 0,1% (Versuch 30) und auf 0,001% (Versuch 31) im Ausgangsversuch keine Beziehung erkennen ließ, wurde das Schicksal der gebotenen Ammonmenge kolorimetrisch verfolgt.

Bei der Annahme einer Reaktionskoppelung etwa nach dem Bilde:

$$2\,NH_4^{\cdot} + H_2SO_4 \rightarrow 2\,N + H_2S + 4\,H_2O$$

würde auf 100 mg $Na_2SO_4 + 10\,H_2O$ (in 100 ccm Versuchslösung) bei restloser Umsetzung ein $NH_4^{\cdot}$-Verbrauch von 11,3 mg (= 28,0 mg NH_4Cl) zu rechnen sein. Für einen $NH_4^{\cdot}$-Verbrauch stehen in der Lösung allerdings berechnungsmäßig nur 3,4 mg/100 ccm $NH_4^{\cdot}$ zur Verfügung. Die Lösung des Ausgangsversuchs enthält in je 100 ccm 3,4 + 4,6 = 8,0 mg $NH_4^{\cdot}$. Zur Umsetzung des darin enthaltenen Sulfats, 48,9 mg/100 ccm $SO_4^{\cdot}$, wären 18,3 mg/100 ccm $NH_4^{\cdot}$ erforderlich.

Zur Prüfung der Annahme wurden beimpfte und unbeimpfte Röhrchen des Ausgangsversuchs nach 12- bis 16tägiger Versuchsdauer in ihrem Ammongehalt mittels des *Nessler*schen Reagens verglichen. Trotz wiederholter solcher Prüfungen konnte zunächst weder von mir noch von anderen[1] eine sichere Abnahme des $NH_4^{\cdot}$-Gehalts der Lösungen gegenüber den Kontrollen festgestellt werden. Zur Untersuchung gelangten solche Versuchsröhrchen, in denen bereits das gesamte Eisen als FeS aus der Lösung ausgeschieden war. Die unbeimpften Kontrollen waren im gleichen Anaerobenapparat mit untergebracht.

Die größte bisher beobachtete Abnahme des Ammons war die von durchschnittlich 25%, was berechnungsmäßig einem absoluten Verbrauch von 2,0 mg $NH_4^{\cdot}$ je 100 ccm Versuchslösung entsprechen würde. Da zu dieser Zeit aber bereits zwei Drittel des gebotenen Sulfats (= 36,5 mg/100 ccm $SO_4^{\cdot}$) umgesetzt waren, für die 13,8 mg $NH_4^{\cdot}$ erforderlich gewesen wären, scheint auch die entwickelte Annahme unwahrscheinlich zu sein. Die Untersuchungen werden in dieser Richtung fortgesetzt.

Wirkung weiterer Versuchsabänderungen.

1. Der Ausgangsversuch wurde dahin abgeändert, daß das Ferroammoniumsulfat (0,1%) durch 0,1% Ferriammoniumsulfat (Versuch 33), 0,1% Ferrosulfat (Versuch 34), 0,1% Ferrisulfat (Versuch 35), Ferriphosphat (0,1% Ferrosulfat — 0,2% K_2HPO_4, Versuch 36), Ferrihydroxyd (0,1% Ferrosulfat + NaOH, Versuch 37, 0,1% Ferrichlorid + NaOH, Versuch 38) ersetzt war. Die übrigen Bedingungen des Ausgangsversuchs sind in den Versuchen 33 bis 38 beibehalten worden.

In allen diesen Versuchen ist die Sulfatreduktion ebenso rasch und, soweit es sich nach solchen qualitativen Versuchen beurteilen läßt, mit dem gleichen Ergebnis abgelaufen; d. h. in den ersten 6 bis 10 Tagen ist eine Schwärzung des Sediments, in den nachfolgenden Tagen eine

---

[1] Herr Dr. *Franz Berger*, Assistent an der biologischen Station in Lunz am See und Herr Dr. *Karl Ondratschek*, Assistent am hiesigen Institut hatten die Freundlichkeit, solche Bestimmungen mit besonderer Genauigkeit auszuführen. Ich danke ihnen auch hier für ihre Hilfsbereitschaft.

FeS-Fällung aus dem als Ferrobicarbonat in Lösung befindlichen Eisen erfolgt.

Wo anfangs nur eine Ferrisalzlösung oder Ferrisalzfällung zugesetzt war, scheint das unter der Einwirkung der CO_2 entstehende $FeCO_3$ das notwendige Redoxpotential einzurichten, das im anderen Falle, bei Zufuhr von Ferrosalzen, von Anfang an schon gegeben ist. Demnach scheint der Schluß berechtigt zu sein, daß die Wertigkeit des anfangs *zugesetzten* Eisens unter den Versuchsbedingungen keinen Einfluß auf den Ablauf der H_2S-Bildung besitzt.

2. Im Ausgangs- und Grundversuch haben sich das Ammonium und Natrium als brauchbare Sulfat-Kationen erwiesen. Bezüglich der Form des Eisens scheint die Frage zur Zeit noch nicht völlig klar zu sein. Bei der Ausführung des Grundversuchs läßt sich das Natrium durch Kalium (0,1 % K_2SO_4, Versuch 39), durch Calcium ($CaSO_4$, Versuch 40) und Magnesium ($MgSO_4$, Versuch 41) mit Erfolg ersetzen. Die beiden letztgenannten Salze werden als Bodenkörper zugesetzt. Die H_2S-Bildung ist in den beiden letztgenannten Versuchen allerdings schwach.

3. Neben der Reduktionsfähigkeit der Sulfate wurde auch die des Natriumthiosulfats und des Natriumsulfits mit Erfolg geprüft[1]. Beim Thiosulfat wird der Prozeß außerordentlich rasch eingeleitet.

4. Einige Versuche sollten auch den Einfluß organischer Stoffe auf den vorliegenden Prozeß der Schwefelwasserstoffbildung im Ausgangs- und Grundversuch zeigen. Die zu prüfenden Stoffe wurden zum Teil in abgestuften Mengen der Grundnährlösung vor der Sterilisation zugesetzt. Alles übrige der Versuchsanordnung und -durchführung wurde unverändert beibehalten. Geprüft und mit zusatzlosen Kontrollkulturen verglichen wurden:

Zugesetzte organische Substanz	Im Ausgangsversuch 0,1 % Ferroammoniumsulfat	Im Grundversuch 0,1 % Natriumsulfat
0,1 % Natriumacetat.	Versuch 44	Versuch 55
0,1 % Natriumtartrat	„ 45	„ 56
0,001, 0,01 und 0,1 % Aethylalkohol.	„ 46, 47, 48	„ 57, 58. 59
0,1 % Saccharose	„ 49	„ 60
0.01 und 0,1 % *Witte*-Pepton ..	„ 50, 51	„ 61, 62
0,1 % Natriumacetat.	„ 52	„ 63
0,1 % Natriumformiat	„ 53	„ 64
0,1 % Natriumcitrat .	„ 54	„ 65

Im *Ausgangsversuch* ist die Wirkung folgende: Eine Beschleunigung des Prozesses sowie seiner Einleitung zeigt nur das Pepton. Äthylalkohol ist in seinen beiden unteren Konzentrationen (Versuche 46 und 47)

[1] Bei Erfüllung gewisser Versuchsbedingungen setzt die H_2S-Bildung mit der gleichen Geschwindigkeit in der Sulfitablauge der Papierfabrikation ein.

wirkungslos. In der höchsten Konzentration (Versuch 48) verhindert er die Eisensulfidbildung. Auch eine Abgabe von H_2S an die umgebende Atmosphäre ist nicht nachweisbar. Acetat, Lactat, Formiat und Saccharose sind in der eingerichteten Konzentration ohne erkennbaren Einfluß auf den Eintritt und Fortgang der Reduktion. Das Tartrat und Citrat, die das Eisen vollständig in Lösung halten, unterdrücken bisweilen den Eintritt der Schwefelwasserstoffbildung.

Im *Grundversuch* verhindert nur ein Zusatz von 0,1 % Äthylalkohol (Versuch 59) die H_2S-Entstehung immer und vollständig. Saccharose (Versuch 60), Acetat (Versuch 55), Lactat (Versuch 63) und Formiat (Versuch 64) erweisen sich als indifferent, d. h. die Schwefelwasserstoffbildung verläuft ebenso wie in den entsprechenden Kontrollkulturen ohne Zusatz. Tartrat und Citrat hemmen stark. Die H_2S-Abgabe ist in diesen beiden Fällen mit Bleiacetatpapier eben nachweisbar.

Aus den eben mitgeteilten Ergebnissen der Versuche mit organischen Zusätzen können zur Zeit selbstredend keinerlei Schlußfolgerungen gezogen werden, weil in den Lösungen noch ein Organismen*gemenge* tätig ist und daher der Einfluß der Zusätze auf die Stoffwechselvorgänge der eigentlichen Sulfatreduzierer durch den Einfluß auf die anderen, unbekannten Prozesse überdeckt sein kann.

5. Von Interesse war ferner der Nitrateinfluß. Ein Kaliumnitratzusatz von 0,001 und 0,01 % (Versuche 66 und 67) ist im *Ausgangsversuch* (Eisenammoniumsulfat) ohne sicher erkennbare Wirkung. Ein solcher von 0,1 % (Versuch 68) hingegen verhindert anfangs die Reduktion vollständig. Die H_2S-Bildung setzt erst nach 12 bis 16 Tagen ein, wenn das Nitrat in der Lösung bereits verbraucht ist. Zu dieser Zeit ist in den beimpften, aber zusatzlosen Kontrollkulturen das gesamte Eisen als FeS ausgefällt. Die gleiche Wirkung läßt sich auch im *Grundversuch* nachweisen (Versuche 69, 70 und 71).

6. Ein Zusatz von 3 % $NaCl$ verhindert die H_2S-Bildung in beiden Versuchsanordnungen (Versuch 72, Ausgangsversuch, Versuch 73, Grundversuch).

7. Durch Phosphatzusatz, KH_2PO_4—Na_2HPO_4-Gemisch von p_H 7,0 wird der Prozeß weder gefördert noch gehemmt. Selbst ein Zusatz von 0,1 Mol/Liter erweist sich noch als wirkungslos.

8. 0,1 % Natriumchlorat als Zusatz hemmt deutlich die Sulfatreduktion (Versuch 74, Ausgangsversuch, Versuch 75, Grundversuch).

Rückblick.

Mit dem Ergebnis der geschilderten Versuche, vor allem jenem des Grundversuchs (Versuch 6), der eine rasche und intensive Sulfatreduktion unter einfachen und übersichtlichen Versuchsbedingungen ohne organische Substanz und ohne erkennbare Mitwirkung anderer

bekannter Wasserstoff- und Energiespender zeigt, ist ein biologischer Prozeß aufgezeigt, der nach den bisherigen Erfahrungen entgegen allen Erwartungen abläuft.

Über die Art der zugrunde liegenden Reaktionen sind zur Zeit keine Anhaltspunkte für bestimmtere Vorstellungen gefunden worden. Ein Urteil wird erst nach eingehenderer Prüfung der beteiligten Organismen und auf Grund der im Gang befindlichen quantitativen Versuche möglich werden. Die bisherigen Versuche lassen es als wünschenswert erscheinen, auch die von anderer Seite bereits eingehend studierten Sulfatreduzierer einer Prüfung neuerlich zu unterwerfen, um zu sehen, inwieweit der vorliegende Fall in früheren Versuchen mitgewirkt hat. Übrigens ist durch die Versuche 66 bis 71 auch die Reduktion der Nitrate ohne zugesetzte organische Substanz aufgezeigt. Es scheinen demnach auch andere Reduktionsvorgänge ohne Mitwirkung von organischen Stoffen und ohne Wasserstoffspender bekannter Art möglich zu sein.

In dem in seinen Einzelheiten zwar noch nicht geklärten Prozeß läßt sich schon jetzt jener Vorgang vermuten, welcher im Lunzer Obersee in einer Tiefe von 10 m und mehr und in anderen Biocönose vorkommt und welcher dort für die Bereitstellung von H_2S sorgt, ohne daß erkennbar größere Mengen an organischen Stoffen beteiligt sind.

Das Vorkommen eines ähnlichen oder gleichen Prozesses wurde schon früher in der starken H_2S-Bildung im Beisein des thermophilen *Thiospirillum pistiense* im sulfatischen Thermalwasser und in synthetisch gewonnenen Mineralsalzlösungen [s. *Czurda* (1936)] bei Darbietung von größeren Mengen an CO_2 vermutet. Mangels geeigneter Vermehrungsbedingungen für den genannten Organismus konnte damals der Fall nicht näher untersucht werden.

Die wochenlange Erhaltung von schwefelführenden Purpurbakteriengesellschaften in Mineralsalzlösungen wird durch die im vorhergehenden geschilderten Versuche vielleicht verständlich gemacht (s. auch S. 192). Auch folgende, mir von Herrn Dr. *Berger*, Lunz, brieflich und durch Farbenaufnahme belegte Erscheinung könnte mit der vorliegenden Sulfatreduktion zusammenhängen. Für bestimmte chemische Untersuchungen wurden Schlammproben des Obersees (14 m Tiefe) in Glasstöpselflaschen unter dem Standortswasser im Kühlschrank bei etwa 4° C und im Dunkeln durch mehrere Wochen aufbewahrt. Die anfangs farblose Standortswassermenge hat sich nach langer Lagerung unter den angegebenen Bedingungen (4° C und völliger Dunkelheit) innerhalb von 3 bis 4 Tagen intensiv rot verfärbt. Der Erreger der roten Färbung war *Chromatium Weissei*.

Zusammenfassung.

Im vorhergehenden wird das Vorkommen einer intensiven Sulfatreduktion in bloßer Mineralsalzlösung, bestehend aus 0,01 % Ammonium-

chlorid, 0,001 % sek. Kaliumphosphat, 0,0001 % Ferrichlorid, 0,1 % *Natriumsulfat* und 0,2 % *Natriumbicarbonat* und *Kohlendioxydüberschuß* beschrieben, die dann einsetzt, wenn die genannte Lösung mit einem bestimmten Keimgemisch beimpft, nach gründlicher Entfernung der Luft einer CO_2-Atmosphäre von etwa 13 % Gehalt ausgesetzt wird.

Die Reduktion findet nicht nur ohne jeden Zusatz von organischen Stoffen statt, sondern auch bei möglichster Ausschaltung von molekularem Wasserstoff und aller in Betracht kommenden Verunreinigungen, selbst dann, wenn die Versuchsanordnung verschiedentlich abgeändert wird.

Der Erreger dieser Gärung ist ein Organismengemisch der *Chromatium Weissei*-Biocönose des Lunzer Obersees. Das Organismengemisch ist auch in anderen Thiorhodobakteriengesellschaften und in *Beggiatoa arachnoidea*-Biocönose angetroffen worden. Durch fortgesetzte Kultur in der obengenannten Lösung, also bei ständigem Ausschluß von organischen Stoffen und Wasserstoff, bleiben im wesentlichen zwei Organismen übrig, ein farbloses Stäbchen und ein farbloses Spirillum vom Aussehen von *Sporovibrio desulfuricans (Beij.) Starkey*. Von diesem binären Konsortium ist nur das Spirillum zur Sulfatreduktion befähigt, wie Plattenguß- und Hochschichtgußserien zeigen.

Die Untersuchung zwecks Auffindung des bisher unbekannten Wasserstoff- und Energiespenders wird fortgesetzt.

Literatur.

Baars, J. K., Over sulfatreductie door bacterien. Diss. Delft 1930. — *Beijerinck, M. W.*, Centralbl. f. Bakt. II, **1**, 1, 49, 104, 1895. — *Buchanan, R. E.*, u. *E. I. Fulmer*, Physiology and Biochemistry of Bacteria, III, London, Bailliere, Tindall and Co., 1932. — *Bunker, H. J.*, A review of the physiology and biochemistry of the sulfur bacteria. Dept. of Sci. and Indus. Chem. Res. Special report No. 3, 1, London 1936. — *Czurda, V.*, Centralbl. f. Bakt. II, **92**, 407, 1935. — *Derselbe*, diese Zeitschr. **7**, 110, 1936. — *Derselbe*, Centralbl. f. Bakt. II, **96**, 138, 1937. — *Delden, A. van*, ebenda II, **11**, 81, 113, 1904. — *Elion, L.*, ebenda II, **68**, 58, 1924. — *Klein, G.*, u. *M. Steiner*, Österr. bot. Zeitschr. **78**, 289, 1929. — *Kluyver, A. J.*, The chemical activities of the Microorganisms. Univ. Press, 1931. — *Müller, H.*, Internat. Rev. d. ges. Hydrobiol. u. Hydrogr. **36**, 433, 1938. — *Nabokitch, A. J.*, u. *A. F. Lebedeff*, Centralbl. f. Bakt. II, **17**, 350, 1906. — *Niel, C. B. van*, diese Zeitschr, **3**, 1, 1931. — *J. Nikitinsky*, Centralbl. f. Bakt. II, **19**, 495, 1907. — *Niklewsky, B.*, ebenda II, **40**, 430, 1914. — *Roelofsen, P. A.*, Metabolism of the purple sulfur bacteria. Diss. Utrecht, 1935. — *Rubentschik, L.*, Centr[illegible]bl. f. Bakt. II, **73**, 483, 1928. — *Ruttner, Fr.*, Arch. f. Hydrobiol. **32**, 2[illegible], 1937. — *Starkey, R. L.*, Proc. Kon. Ned. Akad. Wet. **41**, 422, 1938 — *Derselbe*, Nature **141**, 791, 1938. — *Derselbe*, diese Zeitschr. **9**, 268, 193[illegible] — *Stephenson, M.*, Bacterial metabolism, II. Aufl., London 1939. — [illegible]*phenson, M.*, u. *L. H. Stickland*, Biochem. J. **25**, 215, 1931.

(De l'Institut botanique, Université, Berne.)

Recherches sur la répartition de l'hétérotrophie par rapport à l'aneurine chez les champignons.

Par

W. H. Schopfer et S. Blumer.

Avec 2 figures dans le texte.

(Eingegangen am 11. April 1940.)

L'hétérotrophie par rapport à l'aneurine a été étudiée surtout chez les *Mucorinées*, les *Ustilaginées* et chez les champignons supérieurs à chapeau, particulièrement chez les *Polyporacées*. La liste que nous avons dressée des organismes nécessitant l'aneurine nous montre que par rapport aux auxo-autotrophes, le nombre des auxo-hétérotrophes est relativement restreint.

L'hétérotrophie par rapport à l'aneurine est apparue indépendemment de la position systématique des espèces et atteint tous les groupes de champignons. Il nous a semblé intéressant de poursuivre nos recherches en faisant appel à d'autres organismes que ceux utilisés habituellement comme test. Notre but est de rechercher dans quelle mesure le besoin en aneurine, ou de ses constituants est réparti dans les diverses classes de champignons.

I. Polyporales.

Fries (2) a consacré à ce groupe une étude très soignée. Il montre que plusieurs espèces de *Polyporus* sont dépendantes de l'aneurine mais n'établit pas si éventuellement la pyrimidine ou le thiazol pourrait suffire. Nous nous proposons tout d'abord de mettre au clair cette question. Les organismes utilisés sont les suivants:

Polyporus squamosus (Huds) Fr., *P. abietinus (Dicks) Fr.*, *P. benzoïnus (Wahlbg.) Fr.*, *Polyporus zonatus (Ness) Fr.*, *P. adustus (Willd.) Fr.*, *Polystictus versicolor (L.) Fr.*; toutes les souches proviennent de Baarn. De plus nous avons utilisé *Hypholoma fasciculare (Huds.) Fr.* souche de Berne. Sauf *Polyporus squamosus*, *Polystictus versicolor* et *Hypholoma fasciculare*, ces champignons ont été étudiés par *Fries* qui les classe dans les organismes à aneurine.

Les cultures se font sur notre milieu habituel: glucose puriss. 2%, asparagine puriss. 1 ‰, phosphate acide de potassium 1,5 ‰, sulfate de magnésium 0,5 ‰, p_H 4,2, temp. 18—20°.

La dose d'aneurine utilisée est supraoptimale, soit 1 pour 25 ccm de milieu, dans des Erlenmeyers de 150 ccm. Stérilisation 115° pendant 15 minutes, avec le facteur de croissance. Lorsque l'aneurine est remplacée par ses constituants, ceux-ci sont également présents à la dose de 1 chacun.

Notre but est d'obtenir le meilleur développement possible, compatible avec nos conditions de culture (quantité et hauteur du milieu, forme du vase etc.). Nous ne pouvons nous contenter de la méthode des doses sub-optimales utilisées par *Fries*.

Le développement se mesure au poids sec, déterminé après croissance complète de l'organisme.

Les inoculations se font avec un très petit fragment du thalle de la culture initiale.

Les résultats obtenus sont les suivants (tableau I):

Tableau I.

Espèce	Age de la cult.	O	P	T	P+T	B_1
Polyporus squamosus ...	28 jours	1,9	24,5	1,7	94,5	114,9 mg
„ *abietinus*. ...	28 „	5,2	4,4	4,0	52,0	21,2 „
„ *benzoïnus** ..	28 „	11,8	15,8	14,0	78,5	54,5 „
„ *zonatus 2 a b* .	28 „	0,4	1,5	0,7	89,9	84,3 „
„ „ *7 a' b'*	28 „	2,8	0,9	2,4	91,7	79,9 „
„ *adustus*	27 „	4,9	27,5	3,1	32,4	26,5 „
Polystictus versicolor ...	21 „	3,2	4,7	1,5	119,3	156,4 „
Hypholoma fasciculare ..	22 „	1,3	3,3	0,9	23,6	23,7 „

* Formation de mucilage: pesées peu précises!

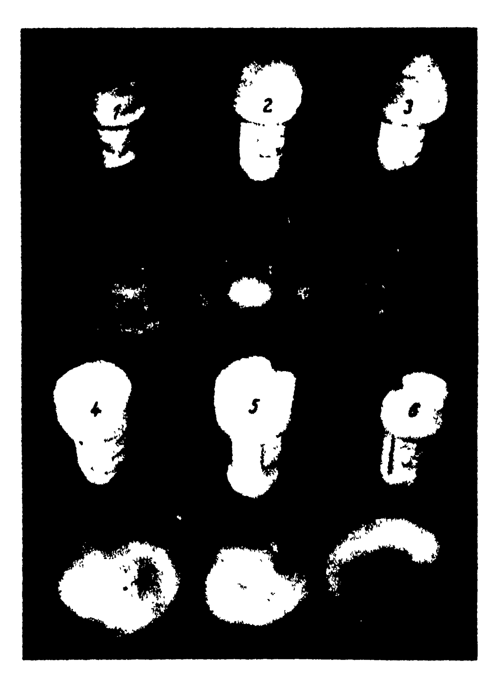


Fig. 1. Croissance de *Polyporus squamosus*. 1. milieu contrôle. — 2. avec pyrimidine. — 3. avec thiazol. — 4. avec pyrimidine + thiazol. — 5. avec aneurine. — 6. sur milieu naturel.

Il ressort de ce tableau que *Polyporus adustus*, qui semble être un champignon à aneurine, se contente en réalité de la pyrimidine. Les autres espèces sont à pyrimidine + thiazol; incapables de faire la synthèse de P et T, elles peuvent encore les condenser en aneurine lorsque ces substances sont offertes comme facteur de croissance.

Pour *Polyporus squamosus*, *zonatus 2 a b* et *Hypholoma fasciculare* la croissance sur P + T est à peu de chose près semblable à celle sur aneurine. Pour *Polyporus abietinus* et *zonatus 7 a' b'* et *benzoïnus*, la croissance est meilleure en présence de P + T qu'avec aneurine. Pour *Polyporus*

versicolor, l'aneurine agit plus favorablement que P + T. Pour *Polyporus adustus*, la pyrimidine remplace exactement l'aneurine. Il est pour l'instant difficile d'expliquer ces différences, qui se montrent constantes avec plusieurs cultures. Lorsque l'aneurine agit plus favorablement que P + T, on peut admettre que la resynthèse de la vitamine B_1 ne se fait pas complètement, ou trop lentement. Cependant le cas contraire, P + T plus actif que la vitamine reste inexpliqué.

Nous remarquons que sauf pour *Polyporus benzoïnus*, les cultures contrôles donnent des poids très faibles et que les résultats obtenus avec les facteurs de croissance sont tels que l'hétérotrophie par rapport à l'aneurine, à ses deux composants, ou à un seul des deux est indiscutable. A part les 6 espèces à P + T et l'espèce à P nous n'avons trouvé aucun organisme exigeant l'aneurine, molécule complète. Il y aurait un grand intérêt à étudier d'autres espèces voisines.

II. Ustilaginales.

Les besoins en aneurine (pyrimidine + thiazol) d'*Ustilago violacea* et d'*U. scabiosae* sont maintenant bien connus (11). Nous avons expérimenté avec les espèces suivantes, du même groupe: *Entyloma arnoseridis Syd.*, *Tilletia horrida Tak.*, *Tilletia tritici (Bjrk) Wint.* et *Tilletia levis Kühn.* Certains *Tilletia* ont été étudiés par *Defago* [communication personnelle du 19. 4. 39 (3)]. Il trouve pour *Tilletia tritici* un besoin en aneurine, molécule complète. Il existe pour ces espèces certaines difficultés d'inoculation.

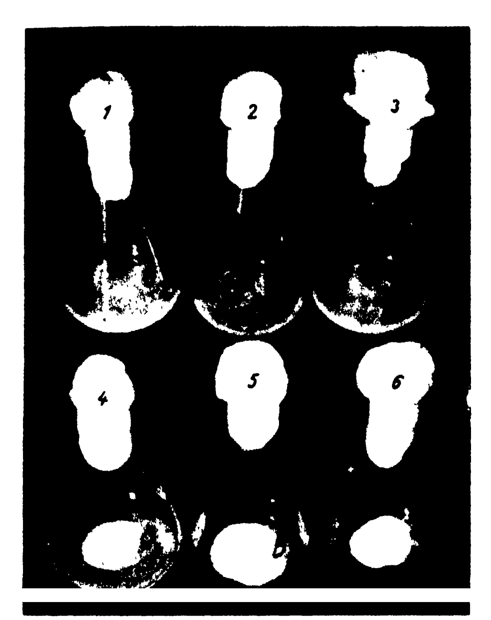


Fig. 2. Croissance de *Tilletia horrida*. 1. milieu contrôle. — 2. avec pyrimidine. — 3. avec thiazol. — 4. avec pyrimidine + thiazol. — 5. avec aneurine. — 6. sur milieu naturel.

Dans nos expériences *Tilletia levis* semble auxo-autotrophe, du moins par rapport à l'aneurine. Pour *Tilletia tritici* nous ne pouvons retrouver la nécessité en aneurine indiquée par *Defago*; le champignon croît faiblement sur milieu contrôle, un peu mieux sur P, PT et B_1. Les différences de souches et de mode d'inoculation sont peut-être la cause de ces différences. Les expériences

ont été faites sur milieu liquide (voir formule ci-dessus) et sur milieu solide avec 2 % d'agar lavé trois fois à l'eau courante d'une manière prolongée[1].

Entyloma arnoseridis ne donne pas de résultats précis et semble auxo-autotrophe (par rapport à l'aneurine). Par contre les résultats sont très nets avec *Tilletia horrida*, qui est étudié pour la première fois à ce point de vue.

Sur milieu liquide, les résultats sont les suivants (tableau II):

Tableau II.

O	P	T	P + T	B_1
1,4	0,6	2,2	57,6	50,2 mg

Ce champignon est un organisme typique à P + T.

Sur milieu solide, la culture apparait sous forme d'une croûte épaisse. Avec les milieux solides et liquides, il se produit un pigment d'un beau rouge-violacé qui diffuse dans le milieu et le colore intensément, avec aneurine et P + T surtout, mais aussi sur milieu naturel. Les faibles cultures contrôles ne produisent pas de pigment.

III. Sphaeriales.

Septoria apii (Br. et Cav.) Rostr., Mycosphaerella confusa Wolf, M. sentina Schroet., M. grossulariae (Fr.) Lindau (souches de Baarn). Ces espèces ont donné les résultats suivants.

Sur milieu liquide:

Septoria apii. (voir tableau III)
Mycosphaerella confusa[2] .... partout bon développement
M. sentina[3] .... idem
M. grossulariae[4] .... idem

Tableau III.

O	P	T	P + T	B_1
15,0	75,6	9,8	120,0	149,5 mg
1,2	42,1	1,4	151,0	120,3 „
moyenne 8,1	58,8	5,7	135,5	134,9 mg

[1] Il est malgré tout difficile d'éliminer complètement les facteurs de croissance et autres substances favorisantes de l'agar. — [2] La croissance est un peu meilleure avec B_1. — [3] O, P, T: développement faible, meilleur avec P + T et B_1. — [4] Aucune différence entre les cultures.

Sur milieu solide:

Septoria apii: partout bon développement, un peu meilleur avec P, P + T et B_1. La présence de facteurs de croissance dans l'agar doit être prise en considération.

Mycosphaerella confusa: partout bon développement; sauf sur les milieux contrôles, il apparait un pigment brun-vert diffusant dans le milieu.

M. sentina: partout développement faible.

M. grossulariae: pas de différence, développement moyen. Nous pouvons donc mettre en évidence une espèce certainement auxo-hétérotrophe par rapport à l'aneurine, susceptible d'être fortement favorisée dans son développement par la vitamine B_1, ou par P + T, ou encore plus faiblement par la pyrimidine seule. Cet organisme est un champignon à pyrimidine incomplet; nous en avons déjà trouvé de semblables, *Absidia ramosa*, *Parasitella simplex* p. ex.

Avec Mycosphaerella sentina, les résultats sont moins clairs; cette espèce semble faiblement activée par l'aneurine et le mélange pyrimidine + thiazol.

Chaetomium elatum Kze et *Schm*, *Chaetomium bostrychoïdes Zopf* donnent lieu à un développement notable sur notre milieu et ne sont pas favorisés par l'aneurine ou ses constituants. Une accélération de croissance par d'autres facteurs n'est pas exclue.

Rosellinia thelena Auersw. ne prospère pas sur notre milieu et n'est pas influencée par l'aneurine.

IV. Plectascales.

Quelques champignons de ce groupe croissent bien sur notre milieu et ne sont pas influencés par l'aneurine et ses constituants: *Monascus purpureus Went*, *Penicillium camemberti Thom (Penicillium caseicolum = P. camemberti Thom?)*, *Gymnoascus setosus Eidam.*

V. Endomycetales.

Pericystis apis.

Cette espèce qui produit le couvain calcifié des abeilles promettait d'être intéressante à maints égards. Elle n'a pas jusqu'à maintenant été étudiée du point de vue de ses facteurs de croissance. *Claussen* décrit son développement en 1921 et Mademoiselle *Maurizio* met en évidence l'existence de deux formes distinctes par la grandeur des carpophores, qu'il n'a pas été possible jusqu'à maintenant d'hybrider (6). Elles se distinguent morphologiquement par la grandeur du carpophore, mais aussi physiologiquement, dans leurs réactions à la température p. ex. Elles sont différentes de *Pericystis alvei.* Mademoiselle *Maurizio* indique comme favorable un milieu

semblable à celui que nous utilisons, mais enrichi avec 1 °/₀₀ d'extrait de levure. Sur milieu synthétique aucune des formes ne se développe.

Elles sont indiscutablement hétérotrophes par rapport à leurs facteurs de croissance. Nous avons eu en main les deux formes, à grands fruits (no. 217 *Liebefeld*-Bern) et à petits fruits (no. 211 *Liebefeld*-Bern).

Action des divers extraits. La forme utilisée est celle à grands fruits. Résultats obtenus (tableau IV):

Tableau IV.

	0	$^5/_{100}$	$^1/_{10}$	$^5/_{10}$	1	2	4 ccm
I	0,8	1	1	2,4	6,8	9,8	13,2 mg
II	—	2	3,6	13,2	30,4	37,2	51 „
III	—	5,8	11,4	23	35,4	34	40,2 „

I, Difco, II, Harris, III, Hoffmann-La Roche. Mêmes conditions de culture que pour *Torulopsis candida.*

Les extraits n'agissent pas dans le même ordre qu'avec *Torulopsis candida* (voir p. 211). L'extrait III est toujours le plus actif; l'extrait II l'est tout autant alors que pour *Torulopsis* il était le moins efficace. Ceci doit nous indiquer que les deux champignons réclament une autre constellation de facteurs de croissance.

Action des substances pures: Sur milieu synthétique, le petit fragment de thalle inoculé ne croît pas; avec adjonction de pyrimidine, de thiazol et d'aneurine, il n'y a aucune amélioration.

Les facteurs de croissance purs suivants furent utilisés: inositol, acide pantothénique de *R. J. Williams*, adermine (vitamine B_6) acide nicotinique, lactoflavine. Ces facteurs furent employés seuls ou en combinaisons diverses avec l'aneurine. Dans aucun des essais, la moindre accélération du développement ne fut observée.

Nous les avons combinés avec l'extrait Hoffmann-La Roche (III). Dans un second essai avec cet extrait les résultats furent les suivants:

$^1/_{10}$	$^5/_{10}$	1	4 ccm
19	62,7	72,5	83,5 mg

(moyenne de 3 déterminations).

Les poids sont notablement plus élevés que dans l'expérience précédente. Nous pouvons considérer la dose de $^5/_{10}$ de ccm comme suboptimale.

Les 6 facteurs ajoutés (tableau V) seuls, ou ensemble, à des doses qui devraient être suffisantes, sont incapables de compléter l'action de la dose suboptimale d'extrait de levure III. Si l'arrêt de croissance

Tableau V.
Extrait de levure seul ($^5/_{10}$ ccm) = 62,7 mg.

Facteurs ajoutés	2	10	20 γ
Extrait $^5/_{10}$ ccm + B_1	53	60,5	62 mg
„ + inositol	—	51,0	54,5 „
„ + acide pantothénique	49	64,5	21,5 „
„ + adermine	37,5	48,5	59 „
„ + acide nicotinique	48	47	54.5 „
„ + lactoflavine		manque	
„ + les 6 facteurs sus-cités (moyenne de 3 déterminations)	61,7	60,2	64,2 „

en milieu synthétique est vraiment produit par une absence de facteurs de croissance, ce qui reste à prouver, ceux-ci doivent être recherchés ailleurs.

Eremascus fertilis Stoppel croît normalement sur notre milieu et n'est pas influencé par l'aneurine.

VI. Fungi imperfecti.

Torulopsis candida (Saïto) Lodder.

Cette espèce, qui croît difficilement sur milieu synthétique, mais très bien sur milieu naturel, fut étudiérécemment par *Rennerfelt* (8).

Des cultures mixtes de cette espèce avec *Penicillium rugulosum* montrent un cas de stimulation unilatérale (7): *Torulopsis candida* est favorisé dans son développement par *Penicillium rugulosum.* L'agar, dans lequel les substances produites par le *Penicillium* ont diffusé permet une très belle croissance de *Torulopsis.* On peut donc admettre que *Torulopsis* a perdu le pouvoir de faire la synthèse de ses facteurs de croissance. Cette espèce complètement auxo-hétérotrophe les reçoit de *Penicillium* (auxo-autotrophe); ils se trouvent également dans la levure pressée et l'extrait de malt [*Foghammar* (1)].

Le cas semble présenter une certaine analogie avec celui que nous avons observé chez *Phycomyces blakesleeanus* (9, 10). Cette espèce, hétérotrophe par rapport à l'aneurine (pyrimidine + thiazol) ne croît pas sur milieu synthétique agarisé. Une infection de *Penicillium* déclanche une croissance intense des hyphes (autour de l'infection!). Pour l'instant on ne connait chez *Phycomyces* qu'un seul facteur de croissance identifié chimiquement, l'aneurine (remplacée par la pyrimidine et le thiazol). Il faut donc admettre que le *Penicillium* livre à *Phycomyces* l'aneurine (ou l'ensemble pyrimidine + thiazol).

Il est vrai qu'autrefois *Hoet* (5) a démontré qu'avec le milieu de culture de *Penicillium* il était impossible de supprimer l'arrêt de croissance provoqué chez le rat par l'absence de facteur B. Nous savons aujourd'hui qu'un tel argument n'est pas probant et que le test animal n'est pas suffisemment sensible pour conférer une valeur quelconque à un résultat négatif. Un

organisme tel que *Phycomyces* qui pour 25 ccm de milieu réclame 0,5 γ de vitamine B_1, ou encore *Ustilago violacea* qui se contente de 0,01 γ pour 25 ccm de milieu doit être utilisé si l'on veut être certain qu'une substance ou un liquide est privé d'aneurine ou non. Sans contester la valeur de l'observation de *Hoet*, confirmée, par *Deas* (4), nous admettons donc que *Penicillium*, dans l'expérience de stimulation unilatérale, fournit à *Phycomyces* le facteur indispensable, probablement l'aneurine ou ses constituants.

Par contre *Hoet* montre que le milieu de culture utilisé de *Penicillium* est capable d'activer la croissance de la levure. Il contient donc très probablement les bios. Il est intéressant, en vérifiant l'expérience de *Rennerfelt*, de rechercher si le *Penicillium* livre également à *Torulopsis candida* l'aneurine ou ses constituants. Nous savons que l'aneurine ou ses constituants sont facteurs de croissance pour certaines espèces de *Torula*. Des essais effectués avec la pyrimidine, le thiazol, les deux ensemble et l'aneurine nous prouvent qu'avec notre milieu, il est impossible de déclancher le développement de *Torulopsis* avec la vitamine B_1 ou ses dérivés. Cependant la croissance est très intense sur milieu naturel, avec extrait de levure p. ex.

Ce cas de stimulation unilatérale ne peut donc être comparé avec celui de *Phycomyces-Penicillium*.

Nous avons utilisé les extraits concentrés suivants: I. Extrait de levure Difco; II. Extrait de levure Harris; III. Extrait concentré Hoffmann-La Roche 3163/4. Chacun des extraits est employé à la dose de 0,2 %, ajouté au milieu synthétique et stérilisé avec lui.

Les résultats sont les suivants (tableau VI):

Tableau VI.

	0	5/100	1/10	5/10	1	2	4 ccm
I	5	20	23	38	36	43	52 %
	5	20	23	32	42	43	59 %
II	5	18	22	28,5	28	34	38 %
	5	16,5	20	24	32	38	37 %
III	5	32	36	50	54	58	55 %
	5	33	38	49	50,5	51	58 %
	5	29	36	55	53	53	50 %

Le développement est mesuré à l'aide de la cellule photoélectrique de Lange. Les chiffres se rapportent au pourcentage d'absorption de lumière.

Les cultures avec 2 et 4 ccm de l'extrait I sont légèrement jaunâtres. Ajoutons que les extraits de levures sont extrèmement concentrés et sont complètement solubles dans l'eau.

Dans l'ordre d'activité décroissant, les extraits de levure s'ordonnent de la manière suivante: Hoffmann-La Roche, Difco, Harris.

Avec III (Hoffmann-La Roche), le développement maximum, mesuré par néphélométrie, est atteint avec $^5/_{10}$ à 1 ccm, avec I (Difco) la dose de 4 ccm est nécessaire; avec II (Harris), le maximum n'est pas atteint dans notre expérience. En se basant sur les résultats de l'extrait III, nous constatons que le meilleur développement est obtenu avec 1 à 2 mg d'extrait ajoutés à 25 ccm de notre milieu.

L'activation du développement doit être produite par d'autres facteurs de croissance que l'aneurine; ils agissent peut-être concurremment avec l'aneurine (synergisme) et restent à identifier; il n'est pas impossible qu'il s'agisse d'un ou plusieurs bios. L'adermine, l'acide pantothénique, l'acide nicotinique n'ont pas été essayés avec cette espèce. Nous nous contentons d'indiquer pour le moment qu'elle ne réagit pas à la présence de l'aneurine tout en étant complètement auxo-hétérotrophe.

Dematium.

*Dematium sp. (Maurizio, Liebefeld-*Bern*)* réagit faiblement à la présence de thiazol, de pyrimidine + thiazol et d'aneurine.

Dematium pullulans De By et *Löw*, *Dematium Chodati Netchich* croissent bien sur milieu synthétique et ne réagissent pas à la présence de l'aneurine et de ses constituants.

Catenularia sp. croît normalement et semble autotrophe par rapport à l'aneurine.

Conclusions.

Cette étude nous permet de mettre en évidence les besoins exacts des *Polyporus* en facteur de croissance. Aucun n'exige vraiment l'aneurine, mais bien la pyrimidine *et* le thiazol ou la pyrimidine seule. Aucune des formes étudiées n'est vraiment liée à la molécule complète de la vitamine B_1. Parmi les *Ustilaginées*, *Tilletia horrida* se révèle comme un organisme à pyrimidine + thiazol. Parmi les *Mycosphaerellacées*, *Septoria apii* est un organisme à pyrimidine + thiazol (incomplètement à pyrimidine). Parmi les *Imperfecti* nous confirmons la forte auxo-hétérotrophie de *Torulopsis candida* en indiquant qu'elle n'est pas due à l'aneurine ou à ses constituants. La stimulation unilatérale *Torulopsis candida-Penicillium rugulosum* est différente de la stimulation *Phycomyces-Penicillium sp.* La forte auxo-hétérotrophie de *Pericystis apis* est mise en évidence. L'aneurine ou ses constituants ne semble jouer aucun rôle de même que 5 autres substances cristallisées employées.

Pour *Torulopsis candida* comme pour *Pericystis apis*, les facteurs indispensables sont à rechercher dans les extraits de levure concentrés, complètement hydrosolubles. Les constellations de facteurs requis par ces deux espèces sont différentes. Il est probable qu'il s'agit réellement de facteurs de croissance, mais il reste à examiner si une modification

quantitative ou qualitative du milieu utilisé ne serait pas capable de suffire au développement.

Il est singulier qu'aucun des champignons étudiés et dépendant de l'aneurine ou de ses constituants ne se révèle comme un organisme à thiazol. Le cas de *Mucor Ramannianus* étudié par *W. Müller* reste jusqu'à maintenant unique (6a, 9).

Nous sommes redevables de l'aneurine, de la pyrimidine, du thiazol, de la lactoflavine et de l'extrait de levure aux Etablissements Hoffmann-La Roche, Bâle (Dr. *M. Guggenheim*), de l'aneurine et de l'adermine à la I. G. Farbenindustrie (Prof. *Hörlein*) et de l'acide pantothénique au Dr. *R. J. Williams*. Nous les remercions vivement, ainsi que Mademoiselle *Maurizio* pour les souches qu'ils nous ont fournies.

Travaux cités.

1) *S. Foghammer*, Bot. Not. 421, 1938. — 2) *N. Fries*, Symbolae botan. Upsaliensis III, 2, 1938. — 3) *G. Defago*, Bull. Soc. botan. suisse **49**, 413, 1939. — 4) *J. Deas*, J. of biol. Chem. **61**, 5, 1924. — 5) *J. Hoet*, Arch. intern. Physiol. **19**, 129, 1922. — 6) *A. Maurizio*, Bull. Soc. bot. suisse **44**, 133, 1935. — 6a) *W. Müller* et *W. H. Schopfer*, C. r. acad Sci Paris, **205**, 687, 1937. — 7) *G. Papacostas* et *J. Gaté*, Les associations microbiennes. Leurs applications thérapeutiques, Encyclop. scientifique, Gaston Doin, Paris 1928. — 8) *E. Rennerfelt*, Svensk Botanisk Tidskrift **32**, 332, 1938. — 9) *W. H. Schopfer*, Ergebn. d. Biol. **16**, 1—172, 1939. — 10) *Idem*, C. r. Soc. physique hist. nat. Genève **50**, 152, 1933. — 11) *W. H. Schopfer* et *S. Blumer*, Arch. f. Mikrobiol. **9**, 305, 1938.

(Aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule Dresden.)

Erfahrungen mit neuen, lang feucht bleibenden Trägern für Nährlösungen an Stelle von Agar.

Von

Friedrich Tobler.

(Eingegangen am 24. April 1940.)

Im Verlauf der langjährigen Kulturversuche, die ich mit Flechten und Flechtenpilzen in verschiedenster Weise angestellt habe, stand ich sehr häufig vor der Aufgabe, gerade bei diesen Gegenständen Kulturen über weit längere Zeit unberührt stehenlassen zu müssen, weil infolge des besonders langsamen Wachstums vor Ablauf einer Frist von einem halben oder mehr als einem Jahre wenig Ergebnisse zu erwarten waren. Überimpfung kam nicht in Frage und so hatte ich sehr häufig mit Schwierigkeiten zu kämpfen insofern, als Agarnährböden während solcher Zeitdauer austrockneten und damit entweder ein Ergebnis überhaupt hinfällig wurde oder aber doch wesentlich veränderte Wachstumsbedingungen für die Objekte entstanden. Ich bemühte mich daher seit mehreren Jahren darum, festzustellen, ob es nicht auch andere als Träger für Nährlösungen geeignete und selbst möglichst indifferente Materialien gäbe, die man gegebenenfalls an Stelle des Agar setzen könnte. Wenn ich heute einige von diesen, übrigens in meiner zusammenfassenden Darstellung der Flechtenkulturmethoden[1] schon angedeuteten Erfahrungen wiedergebe, so geschieht das mit folgenden Einschränkungen:

1. bin ich mir vollständig darüber im klaren, daß die von mir herangezogenen neuen Träger für Nährlösungen nur dann in Frage stehen, *wenn Durchsichtigkeit des Substrats nicht verlangt wird*;

2. ist bei ihnen allen eine weit größere *Unebenheit der Oberfläche* mit in Kauf zu nehmen als sie beim Agar sonst geboten wird und selbstverständlich begrüßt werden muß. Aber es kommt ja in vielen Fällen, und nicht nur bei meinen Objekten, nicht darauf an, die Kulturgefäße (z. B. Petrischalen) unmittelbar im durchfallenden Licht zu betrachten, sondern vielmehr nur darauf, überhaupt ein Wachstum feststellen und später vielleicht losgelöste Objekte oder Objektteile zu zergliedern und zu beobachten. Und diese letztgenannten Möglichkeiten bestehen bei einer Reihe von neuen Materialien nach meinen Erfahrungen durchaus. Ich füge endlich noch von vornherein hinzu, daß als besonders brauchbar mir

[1] *Fr. Tobler*, Kultur von Flechten in Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmethod. XII, 2, 1498, 1939.

meine neuen Methoden bei der Benutzung von *Petrischalen* erscheinen, mache allerdings dabei die Voraussetzung, die man auch sonst weit mehr zu machen gut täte als es gewöhnlich geschieht, nämlich, daß man wirklich gut schließende und genau zueinander passende Petrischalenteile benutzt. Hierzu sei nebenbei bemerkt, daß ich längst für solche dauerhafte Kulturen, bei denen Verdunstung starke Gefahr bedeutet, nur *best abgepaßte und in Deckel wie Boden mit Nummern versehene Schalen* benutze. Sämtliche Erfahrungen in der Verdunstung gehen auf mindestens allmonatlich wiederholte genaue Wägungen der bezifferten Schalen zurück. Die Kulturen wurden ausgeführt mit *Flechten*, *Flechtenpilzen*, einer Reihe *Schimmelpilzen*, *Orchideenwurzelpilzen*, umfangreichere Kolonien bildenden *Bakterien* wie *B. prodigiosum*, farbigen *Lufthefen* u. a. m.

I. Bekanntlich wurden von jeher und namentlich früher für Pilze und auch Flechten, Agarnährböden mit organischen Lösungen von nicht genau bekannter Zusammensetzung verwandt (Malzextrakt, Bierwürze usw.). Von derartigen Erfahrungen ging ich aus, als ich mich zuerst mit *Torf* als Unterlage befaßte. Gut gereinigter, mehrfach gründlich ausgespülter und gleichmäßig weitgehend zerkleinerter Torf bietet günstige Möglichkeiten. Am vorteilhaftesten ist es dabei, einen reinen *Sphagnum*torf zu wählen. Dieser bietet stofflich tatsächlich so gut wie gar nichts, was bei der Ernährung darauf wachsender Objekte eine Rolle spielen könnte. Er nimmt aber wie *Sphagnum* im allgemeinen, Lösungen ja außerordentlich gut auf, und so fällt es nicht schwer, einen solchen feinkrümeligen Torf mit Lösungen gleichmäßig zu durchtränken. Die Schicht wird im allgemeinen kaum höher als 2 mm (in trockenem Zustand) in die Petrischale gebracht. Bei der Durchfeuchtung quillt sie etwa auf die doppelte Höhe auf, was also ganz flache Petrischalen ausschließt.

Die Oberfläche wird nach der Aufquellung unebener als sie es vorher ist, aber für viele Gegenstände ist das belanglos. Das Feuchtbleiben von Torf zeigt sich aber ganz erstaunlich groß. Ich habe Petrischalen im Brutschrank bei Temperaturen von 20 bis 25° *weit über 1 Jahr in angemessener Feuchtigkeit halten können*, womit also die Leistung eines Agarnährbodens in dieser Beziehung bei weitem übertroffen ist. Die Abnahme der Feuchtigkeit vollzieht sich zuerst keineswegs schneller, sondern bleibt vollkommen gleichmäßig. In jedem Monat wird nur etwa $^4/_{10}$ % des Gesamtgewichts abgegeben, so daß auch nach Ablauf eines Jahres ein kaum merkbarer Verlust vorhanden ist.

Ebenso wie *Sphagnum*torf ließ sich auch reines zerkleinertes *Sphagnum* unmittelbar verwenden, so wie dieses in der Gärtnerei üblich ist zur Kultur von Orchideen usw.

II. Im Anschluß hieran bemühte ich mich auch bereits, mit bestimmten Stoffen getränkten Torf, sog. *Huminal* der I. G. Farbenindustrie A.-G., heranzuziehen und habe auch hiermit guten Erfolg gehabt. Im Huminal sind im wesentlichen Gaben von Kali und Stickstoff enthalten, was man bei der Benutzung entsprechend berücksichtigen kann. Im übrigen ist auch dieser Stoff dem Torf sehr ähnlich, doch scheint mir die Feuchtigkeitsabgabe etwas größer zu sein als bei reinem *Sphagnum*torf. Es geht das offenbar darauf zurück, daß der zur Herstellung des Huminal hergestellte Torf nicht reiner *Sphagnum*torf gewesen ist. Jedenfalls habe ich auch mit Huminal gefüllte Petrischalen *über 1 Jahr lang so erfreulich feucht halten können*, wie es niemals bei Agarnährböden der Fall gewesen ist.

III. Ich habe weiter eine brauchbare Unterlage finden können in *Vistraabfällen*, die ich der Freundlichkeit der Hersteller verdankte. Vistra ist reine Cellulose und also für die Allgemeinheit vieler zu kultivierender Objekte völlig indifferent bei der Ernährung. Vermöge ihres Baues saugt sie aber außerordentlich gut wässerige Lösungen auf und hält sie entsprechend fest. Anscheinend wirkt dabei der im Querschnitt sehr stark und vielfach eingeschnittene Umriß der Oberfläche sehr günstig auf die Festhaltung der Flüssigkeit. Ein besonderer Vorteil dieses Materials ist die schöne weiße Farbe, auf der sich die Objekte ausgezeichnet abheben. Unzweckmäßig ist es aber, die Zerkleinerung des Materials durchzuführen, weil zu kurze Stückchen der Kunstfäden natürlich weniger gut feucht bleiben als längere. Auf der anderen Seite ist es aber bei längeren Stücken weit schwieriger, eine einigermaßen glatte Oberfläche herzustellen. Ich versuchte zunächst, das Material durch Zerzupfen in trockenem Zustand gleichmäßig auf dem Boden der Schale auszubreiten. Wenn das auch gelungen schien, so ergaben sich, infolge eingetretener Zusammenballungen beim Aufquellen, doch beträchtliche Höhenunterschiede, was die Benutzung weniger angenehm machte.

Ich versuchte daher zunächst, gleichmäßig gestrecktes Material auszubreiten, konnte das aber bei den zur Verwendung gelangenden Abfällen verhältnismäßig schwer erreichen. Eine Besserung ließ sich aber herbeiführen dadurch, daß ich möglichst gleichmäßig hergestellte Lagen angefeuchtet zunächst stark preßte und diese, nach der Größe der Petrischale zurecht geschnittenen flachen Kuchen einlegte und quellen ließ. Damit bekam man eine wesentlich verbesserte glatte und weiße Fläche, auf der die Objekte sich sehr gut halten ließen. Es wäre eine rein technische Aufgabe anderer Stellen, solches Abfallmaterial in dieser Beziehung maschinell zweckmäßig zu formen. Was nun die Feuchthaltung der Vistraabfälle als Unterlagen betrifft, so ist hier allerdings die Dauer nicht ganz so günstig wie bei Torfunterlagen. Im allgemeinen

sind solche Böden in längstens 4 bis 5 Monaten ausgetrocknet. Es kommt allerdings darauf an, was man für Lösungen verwendet. Nährbouillon z. B. hält sich wesentlich länger als mineralische Lösungen und es könnte allerdings bei Kulturen mit solchen Substanzen diese Unterlage besonders empfohlen werden. Ich habe jedenfalls Kulturen auch *mit Vistra 5 Monate gut zu halten vermocht.*

Im Anschluß hieran sei bemerkt, daß ich auch Abfälle von anderen Kunstfasern zur Benutzung herangezogen habe. Es ist interessant, daß sie je nach der Form der Kunstfaser zum Teil auch weniger gut geeignet sind, weil sie die Feuchtigkeit, z. B. bei glatter Oberfläche, weniger gut halten. Ebenso sind aber auf manchen Kunstfasern auch künstliche Überzüge vorhanden, die die Feuchtigkeit weniger gut aufnehmen lassen, wodurch auch schnellere Eintrocknung eintritt.

Es war ursprünglich die Absicht, eine umfangreiche Untersuchung auf diesem Gebiet vorzunehmen und noch dadurch zu vertiefen, daß von den einzelnen als Unterlage benutzten Stoffen auch Analysen bezüglich der in ihnen enthaltenen Stoffe hergestellt wurden. Diese Untersuchung ist aber — unter meiner Leitung begonnen und erfolgreich fast zu Ende geführt — zu meinem großen Bedauern dann liegen geblieben und dürfte kaum mehr veröffentlicht werden. Der Kern ihres Inhalts war aber der, daß jedenfalls sehr geringe Stoffmengen in den betreffenden Böden von Beginn an vorhanden sein dürften, noch dazu durch Auswaschung einigermaßen sicher entfernt werden können und daß ihnen daher keine Rolle bei der Ernährung selbst zufällt. Im ganzen sind jedenfalls die hier erwähnten und erprobten Unterlagen vielleicht geeignet, einen *Ersatz für Agar* unter gewissen Umständen zu bieten, eine Tatsache, die durchaus nicht nur mit Rücksicht auf die gegenwärtige Zeit, sondern auch auf die Wünsche nach lange feucht bleibenden Kulturen, eine gewisse Bedeutung haben kann.

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Deutschen Karls-Universität in Prag.)

Vitamine als vermehrungsbegrenzende Faktoren bei Haematococcus pluvialis.

Von

Karl Ondratschek.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 27. April 1940.)

In einer vorangegangenen Mitteilung (*Ondratschek*, 1940) wurde gezeigt, daß *Haematococcus pluvialis* bei Züchtung in einer reinen Mineralsalzlösung durch Ascorbinsäure, in einer Nährlösung mit organischer Kohlenstoff- und Stickstoffquelle durch Aneurin in seiner Vermehrung wesentlich gefördert wird. Bestimmte Versuche in der genannten Arbeit zeigten auf, daß die Zellenzahl durch die vermehrungsfördernde Wirkung der beiden Vitamine innerhalb der ersten 8 bis 10 Tage der Versuchsdauer mehr oder minder rasch zunimmt, nach diesem Zeitpunkt aber fast gänzlich unverändert bleibt.

Es schien nun zweckmäßig, ergänzende Versuche darüber anzustellen, was das Absinken der Vermehrungsintensität veranlaßt. Nach der obengenannten Mitteilung kamen im wesentlichen nur zwei Faktoren in Frage: der völlige Verbrauch der anfänglich zugesetzten Vitaminmengen oder der durch Aufbrauchen der Nährstoffe verursachte Mangel an lebenswichtigen Verbindungen. Zur Klärung dieser Fragen wurden die im folgenden geschilderten Versuche angestellt.

Ein Eingehen auf die Methodik kann hier unterbleiben, da alles Nötige in der genannten Mitteilung (*Ondratschek*, 1940) enthalten ist.

Zur Züchtung in einer reinen Mineralsalzlösung wurde die folgende Nährlösung verwendet: KNO_3 0,1%, K_2HPO_4 0,001%, $MgSO_4$ 0,001%, $CaCl_2$ 0,001% und $FeCl_3$ 0,0001%. Die Reaktion der Nährlösung lag 24 Stunden nach der Sterilisation (= Zeitpunkt der Beimpfung) um $p_H = 7,0$.

Um gleichzeitig die Kohlensäureassimilation und die Aufnahme organischer Nährstoffe zu ermöglichen, deren gleichzeitiges Stattfinden in einer folgenden Mitteilung behandelt werden soll, wurde die folgende Nährlösung verwendet: Na-Acetat 0,2%, Asparagin 0,1%, K_2HPO_4 0,001%, $MgSO_4$ 0,001%, $CaCl_2$ 0,001% und $FeCl_3$ 0,0001%. Reaktion um $p_H = 7,0$.

Zur Herbeiführung heterotropher Ernährung wurde die gleiche Lösung wie oben verwendet, die Kulturen jedoch im Dunkeln gehalten.

Jede der genannten Nährlösungen erhielt dann folgende Zusätze: Zu einem Teil der Nährlösung kam 0,0001% Aneurin, zu einem anderen

Teil 0,0001 % Ascorbinsäure, und ein dritter Teil blieb ohne Zusatz zur Kontrolle.

Die Beimpfung erfolgte mit einer homogenen *Haematococcus*-Aufschwemmung derart, daß zu jedem Versuchsröhrchen 1 Tropfen Aufschwemmung mit ungefähr 25 Zellen zugesetzt wurde.

Innerhalb der ersten zehn Versuchstage nahm die Zahl der Zellen in der Volumeinheit in der gleichen Weise zu, wie es in der vorangegangenen Arbeit aufgezeigt wurde. Nach 10 Tagen erfolgte ein neuerlicher Zusatz von Vitaminen bzw. Nährstoffen, und zwar derart, daß zu je einem Teil der Röhrchen der drei genannten Versuchsgruppen Aneurin, zu je einem weiteren Teil Ascorbinsäure, zu je einem dritten Teil Nährstoffe zugesetzt wurden, alle in der gleichen Konzentration, wie anfänglich angewendet worden war. Ein je vierter Teil der Röhrchen blieb ohne weiteren Zusatz. Nach weiteren 10 Tagen Versuchsdauer ergab sich folgendes:

A. Bei Züchtung in einer reinen Mineralsalzlösung am Licht.

1. Zellgemische anfangs mit Ascorbinsäure behandelt (Abb. 1).

Ein zweiter Zusatz von Ascorbinsäure ließ die Vermehrung neuerdings ansteigen, bis nach 6 bis 8 Versuchstagen eine maximale Zellen-

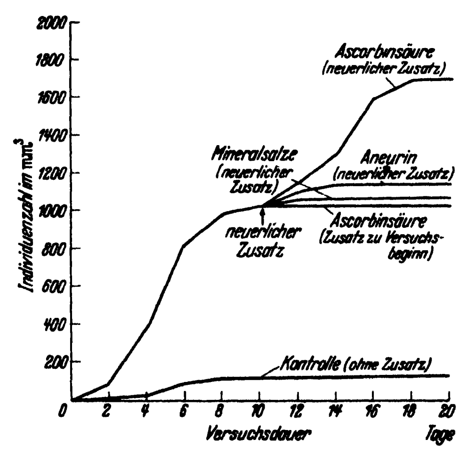


Abb. 1. Vermehrungsverlauf von *Haematococcus pluvialis* bei Züchtung in reiner Mineralsalzlösung mit Ascorbinsäure.

zahl im cmm erreicht war, welche durch weitere Zusätze des gleichen Vitamins nicht mehr gesteigert werden kann. Ein Zusatz von Aneurin am zehnten Versuchstage läßt jedoch nur unmerklich die Vermehrung neuerlich ansteigen. Ebenso hat ein Zusatz von anorganischen Nährsalzen keine neuerliche, vermehrungsanregende Wirkung.

2. *Zellgemische anfänglich mit Aneurin behandelt* (Abb. 2).

Ein Ascorbinsäurezusatz am zehnten Versuchstage bewirkt eine bedeutende Zunahme der Zellenzahl, die Ernteerträge sind von gleicher Höhe wie bei Züchtung in einer Lösung, der vom Anfang an Ascorbinsäure zugesetzt war. Eine neuerliche Beigabe von Aneurin, wie auch von Mineralsalzen ändert nichts an der Höhe des Ernteertrages.

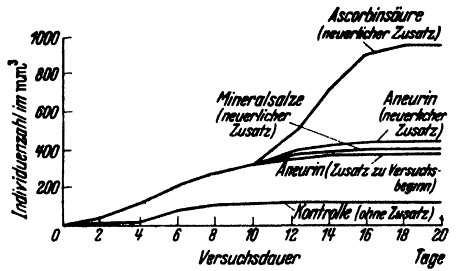


Abb. 2. Vermehrungsverlauf von *Haematococcus pluvialis* bei Züchtung in reiner Mineralsalzlösung mit Aneurin.

B. Bei Züchtung in einer Nährlösung mit Asparagin und Acetat am Licht.

1. *Zellgemische anfangs mit Ascorbinsäure behandelt* (Abb. 3).

Innerhalb der ersten 10 Versuchstage steigt die Zellenzahl in der üblichen Weise an, ein am zehnten Tage erfolgter neuerlicher Zusatz

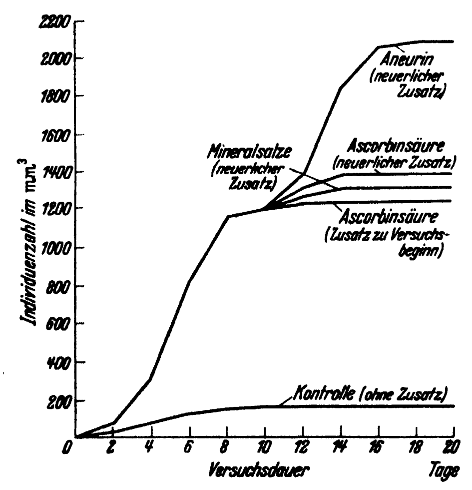


Abb. 3. Vermehrungsverlauf von *Haematococcus pluvialis* bei Züchtung in Mineralsalzlösung mit Asparagin und Acetat am Licht. Ascorbinsäurezusatz.

von Ascorbinsäure hat keinen vermehrungsfördernden Einfluß, eine Beigabe von Aneurin hingegen läßt den Zellenertrag auf das Doppelte ansteigen. Zusätze von Nährstoffen (Asparagin, Acetat und Mineralsalze) ändern nichts am vorhergehenden Zustand.

2. Zellgemische anfänglich mit Aneurin behandelt (Abb. 4).

Während der ersten 10 Versuchstage nimmt die Zahl der Zellen im cmm in ähnlicher Weise zu, wie bei Züchtung in der gleichen Nährlösung mit Ascorbinsäure. Ein am zehnten Tage erfolgter Zusatz von

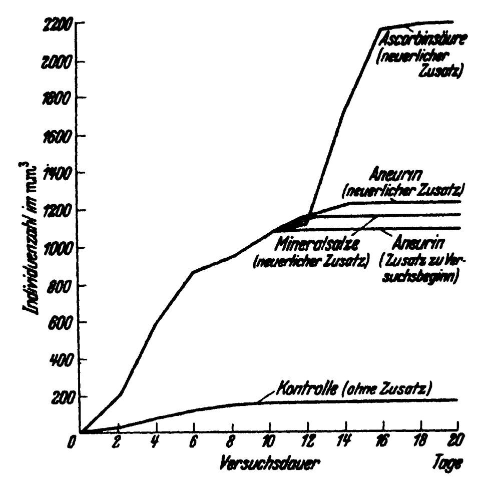


Abb. 4. Vermehrungsverlauf von *Haematococcus pluvialis* bei Züchtung in Mineralsalzlösung mit Asparagin und Acetat am Licht. Aneurinzusatz.

Ascorbinsäure läßt jedoch die Individuenzahl neuerdings stark ansteigen. Neuerliche Beigaben von Aneurin, wie auch von Nährstoffen bleiben ohne Erfolg.

C. Bei Züchtung in einer Nährlösung mit Asparagin und Acetat im Dunkeln.

1. Zellgemische anfangs mit Ascorbinsäure behandelt (Abb. 5).

Während der ersten 10 Tage der Versuchsdauer bewirkt Ascorbinsäure ein mäßiges Ansteigen der Zellenzahl. Wird am zehnten Versuchs-

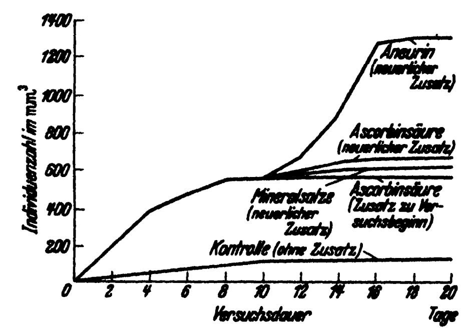


Abb. 5. Vermehrungsverlauf von *Haematococcus pluvialis* bei Züchtung in Mineralsalzlösung mit Asparagin und Acetat im Dunkeln. Ascorbinsäurezusatz.

tage neuerdings Ascorbinsäure zugesetzt, so unterbleibt eine weitere Steigerung, setzt man hingegen Aneurin zu, so nimmt die Zahl der Zellen im cmm in starkem Maße neuerdings zu. Ein Zusatz der üblichen Nährstoffe bleibt auch hier ohne nennenswerten Einfluß.

2. *Zellgemische anfänglich mit Aneurin behandelt* (Abb. 6).

Die am zehnten Versuchstag zum Abflauen gelangte Vermehrung wird durch einen Ascorbinsäurezusatz nicht mehr gesteigert. Setzt man hingegen Aneurin neuerdings zu, dann tritt eine starke Zunahme der Zellenzahl ein. Eine Beigabe von Nährstoffen bleibt auch hier ohne Wirkung.

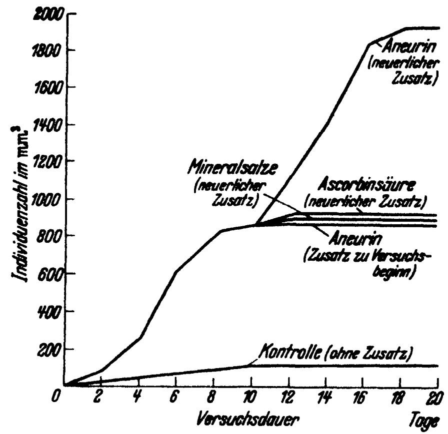


Abb. 6. Vermehrungsverlauf von *Haematococcus pluvialis* bei Züchtung in Mineralsalzlösung mit Asparagin und Acetat im Dunkeln. Aneurinzusatz.

In einigen weiteren Versuchsreihen wurden die eben aufgezeigten Verhältnisse durch Bestimmungen des Trockengewichts der Ernteerträge zusätzlich sichergestellt.

Zur Verwendung gelangten die gleichen Nährlösungen und Vitaminzusätze wie eben besprochen. Die Versuche wurden mit 250 ccm Lösung in 300-ccm-Erlenmeyerkolben aus Schottglas Nr. 20 durchgeführt, die Beimpfung erfolgte in gleicher Weise wie vorher. Jeder einzelne Versuch wurde dreimal durchgeführt.

Die ersten nach 10 Versuchstagen durchgeführten Trockengewichtsbestimmungen hatten das folgende Ergebnis.

Tabelle I. Trockengewicht von *Haematococcus pluvialis* nach zehntägiger Züchtung in einer reinen Mineralsalzlösung am Licht.

Nährlösung	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	Faktor
Ohne Vitamin	0,0142	0,0156	0,0162	0,0153	—
Mit Ascorbinsäure	0,1256	0,1302	0,1296	0,1285	8,4
Mit Aneurin	0,0550	0,0592	0,0521	0,0554	3,6

Tabelle II. Trockengewicht von *Haematoccocus pluvialis* nach zehntägiger Züchtung in einer Mineralsalzlösung mit Asparagin und Acetat am Licht.

Nährlösung	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	Faktor
Ohne Vitamin	0,0256	0,0248	0,0253	0,0252	—
Mit Ascorbinsäure	0,1685	0,1829	0,1765	0,1760	7,0
Mit Aneurin	0,1564	0,1694	0,1698	0,1652	6,7

Tabelle III. Trockengewicht von *Haematococcus pluvialis* nach zehntägiger Züchtung in einer Mineralsalzlösung mit Asparagin und Acetat im Dunkeln.

Nährlösung	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	Faktor
Ohne Vitamin	0,0076	0,0082	0,0062	0,0077	—
Mit Ascorbinsäure	0,0526	0,0426	0,0512	0,0488	6,3
Mit Aneurin	0.1060	0.0987	0.0920	0.0989	12.9

Die nach weiteren 10 Tagen, also nach insgesamt 20tägiger Versuchsdauer durchgeführten Bestimmungen ergaben dann die folgenden Trockengewichte.

Tabelle IV. Trockengewicht von *Haematococcus pluvialis* nach 20tägiger Züchtung in reiner Mineralsalzlösung am Licht.

Nährlösung	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	Faktor
Ohne Vitamin	0,0146	0,0159	0,0162	0,0156	—
Mit Ascorbinsäure, am 10. Tage Zusatz von:					
Kein Zusatz	0,1266	0,1310	0,1286	0,1287	8,2
Ascorbinsäure	0,2061	0,1989	0,1992	0,2014	13,0
Aneurin	0,0130	0,0136	0,0139	0,0135	8,7
Mineralsalzen	0,0141	0,0136	0,0132	0,0136	8,7
Mit Aneurin, am 10. Tage Zusatz von:					
Kein Zusatz	0,0602	0,0596	0,0615	0,0604	3,9
Ascorbinsäure	0,1246	0,1252	0,1241	0,1246	8,9
Aneurin	0,0625	0,0636	0,0629	0,0630	4,0
Mineralsalzen	0,0611	0,0624	0,0613	0,0616	3,9

Tabelle V. Trockengewicht von *Haematococcus pluvialis* nach 20tägiger Züchtung in einer Mineralsalzlösung mit Asparagin und Acetat am Licht.

Nährlösung	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	Faktor
Ohne Vitamin	0,0284	0,0276	0,0290	0,0283	—
Mit Ascorbinsäure, am 10. Tage Zusatz von:					
Kein Zusatz	0,1812	0,1802	0,1831	0,1815	6,4
Ascorbinsäure	0,2016	0,2112	0,2002	0,2043	7,4
Aneurin	0,3261	0,3224	0,3241	0,3242	11,5
Mineralsalzen	0,1946	0,1960	0,1938	0,1950	6,9
Mit Aneurin, am 10. Tage Zusatz von:					
Kein Zusatz	0,1656	0,1662	0,1676	0,1665	5,9
Ascorbinsäure	0,3368	0,3376	0,3372	0,3372	11,9
Aneurin	0,1702	0,1720	0,1722	0,1715	6,1
Mineralsalzen	0.1700	0.1689	0.1680	0,1690	6,0

Tabelle VI. Trockengewicht von *Haematococcus pluvialis* nach 20tägiger Züchtung in einer Mineralsalzlösung mit Asparagin und Acetat im Dunkeln.

Nährlösung	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	Faktor
Ohne Vitamin	0,0082	0,0079	0,0083	0,0081	—
Mit Ascorbinsäure, am 10. Tage Zusatz von:					
Kein Zusatz	0,0500	0,0497	0,0506	0,0501	6,3
Ascorbinsäure	0,0562	0,0571	0,0555	0,0563	7,0
Aneurin	0,1210	0,1192	0,1196	0,1199	14,8
Mineralsalzen	0,0520	0,0509	0,0526	0,0518	6,4
Mit Aneurin, am 10. Tage Zusatz von:					
Kein Zusatz	0,1006	0,0989	0,1019	0,1005	12,4
Ascorbinsäure	0,1065	0,1046	0,1075	0,1060	13,1
Aneurin	0,2104	0,2111	0,2109	0,2108	27,0
Mineralsalzen	0,1102	0,1092	0,1098	0,1097	13,5

Besprechung der Versuchsergebnisse.

In den vorstehenden Versuchsreihen konnte der Beweis dafür erbracht werden, daß das Abnehmen der Vermehrung mit zunehmender Versuchsdauer nur auf dem Verbrauch des zugesetzten Vitamins beruht. Bei Züchtung in einer reinen Mineralsalzlösung am Licht, wie auch in einer Lösung mit organischen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen im Dunkeln liegen die Verhältnisse einfach: im ersteren Falle ist, wie früher schon festgestellt, Ascorbinsäure der für die Vermehrung notwendige Wachstumsfaktor. Die anfänglich zugesetzte Menge von 0,0001 % ist nach 8 bis 10 Tagen verbraucht, ein neuerlicher Zusatz des gleichen Vitamins läßt die Vermehrung aufs neue ansteigen. Das gleiche gilt auch für den oben an zweiter Stelle genannten Fall, nämlich für Aneurin bei Ernährung mit organischen Stoffen.

Bei Züchtung in reiner Mineralsalzlösung am Licht hat aber auch Aneurin eine gewisse Wirkung, wenn auch die erzielten Ernteerträge hinter den mit Ascorbinsäure erzielten beträchtlich zurückbleiben. Ein neuerlicher Zusatz von Aneurin am zehnten Tage hat aber *keinen* weiteren vermehrungsfördernden Einfluß, hingegen läßt neuerlich zugesetzte Ascorbinsäure die Vermehrung wiederum ansteigen.

Ganz gleich liegen die Verhältnisse bei Züchtung von *Haematococcus pluvialis* in einer Nährlösung mit organischer Kohlenstoff- und Stickstoffquelle und Ascorbinsäurezusatz im Dunkeln. Das C-Vitamin wirkt auch hier nur schwach fördernd, ein weiterer Zusatz nach 10 Tagen ist wirkungslos, nur ein Zusatz von Aneurin ist imstande, die Vermehrung wieder ansteigen zu lassen.

Auch hier wiederum sehen wir, daß Ascorbinsäure der maßgebende Faktor bei der autotrophen, Aneurin bei der heterotrophen Ernährungsweise ist.

Bei Züchtung von *Haematococcus pluvialis* in einer Lösung mit organischen Nährstoffen am Lichte, also unter „mixotrophen Bedingungen“, sehen wir hingegen eine ungefähr gleich starke Wirkung von Ascorbinsäure und Aneurin. In beiden Fällen läßt sich der Ernteertrag durch neuerliche Beigabe des gleichen Vitamins nicht mehr steigern, wohl aber dann, wenn wir der ursprünglich ascorbinsäurehaltigen Nährlösung Aneurin, bzw. der anfänglich aneurinhaltigen Lösung Ascorbinsäure zufügen. Dann bekommen wir in beiden Fällen ein erneutes Ansteigen der Vermehrungskurve.

Zusammenfassung.

Es wird gezeigt, daß die Vermehrung allein von dem zur Verfügung stehenden Vitamin beeinflußt wird. Ist dieses verbraucht, dann kann nur ein neuerlicher Vitaminzusatz die Vermehrung wieder ansteigen lassen. Ein weiterer Zusatz von Nährsalzen hat keine Wirkung.

Literatur.

K. Ondratschek, diese Zeitschr. 11, 89, 1940. Hier weitere Literaturangaben.

Johannes Behrens †.

Am 25. Juli 1940 verstarb zu Hildesheim der Geheime Oberregierungsrat

Professor Dr. **Johannes Behrens**

im 77. Lebensjahre nach einem arbeitsreichen, der angewandten Botanik gewidmeten Leben.

Geboren am 24. Januar 1864 in Hildesheim, studierte er in Göttingen, Tübingen und Kiel; hier promovierte er 1886. 1894 habilitierte er sich in Karlsruhe, wo er 1890 bis 1900 an der Landwirtschaftlich-Botanischen Versuchsanstalt tätig war. Nach kurzer Leitung der Württembergischen Weinbauversuchsstation Weinsberg (1900 bis 1901) war er 1901 bis 1907 Direktor der Badischen Landwirtschaftlichen Versuchsanstalt Augustenberg und übernahm am 1. August 1907 die Direktion der Biologischen Reichsanstalt in Berlin-Dahlem, bis er zum 1. Januar 1920 in den Ruhestand trat. Von dieser Zeit an lebte er in Hildesheim.

Nach anatomischen und entwicklungsgeschichtlichen Arbeiten auf dem Gebiete der reinen Botanik widmete er sich der angewandten Seite, wobei er seine besondere Liebe der Mikrobiologie zuwandte. Seine Arbeiten tragen ihre besondere Note. Sie beschränken sich nicht auf das Einzelproblem, sondern suchen die Gesamtheit des Vorganges zu erfassen, wie seine schönen Beiträge zur Kenntnis der Obstfäulnis und der Röste von Flachs und Hanf zeigen. Insbesondere aber beschäftigen sie sich mit der Nutzpflanze als ganzem Objekt und führen zu einer monographischen Bearbeitung, in der, wie bei der Tabakfermentation und gewissen Veränderungen bei der Lagerung von Hopfen, die mikrobiologischen Vorgänge als ein Teilproblem in der Gesamtheit der an der Pflanze auftretenden Lebenserscheinungen ihren Platz finden.

Umfassendes und tiefschürfendes Wissen sowie scharfe, kritische Sichtung sind hierbei das Rüstzeug. Die zahlreichen, von *Behrens* bearbeiteten Abschnitte in *Lafar*s Standardwerk legen insbesondere von seinem mikrobiologischen Wissen und Arbeiten und der Einordnung in die größeren Zusammenhänge des Gebietes beredtes Zeugnis ab.

Herausgeber und Verlag bedauern aufs tiefste das Hinscheiden des Mitbegründers und langjährigen Mitherausgebers dieser Zeitschrift, der noch in biblischem Alter seine Fähigkeiten selbstlos zur Verfügung stellte und erst infolge zunehmenden Alters die ihm lieb gewordene Tätigkeit aufgeben mußte.

In einer Zeit, die zur weitgehenden Zersplitterung in Einzelprobleme neigt, möge sein ganzheitsstrebendes Wirken ein stetes Vorbild bleiben!

Der Herausgeber:
August Rippel.

Der Verlag.

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Deutschen Karls-Universität in Prag.)

Experimentelle Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Vitaminbedürfnis und Verlust des Synthesevermögens einiger mixotropher Algen.

Von

Karl Ondratschek (Prag).

(Eingegangen am 22. Mai 1940.)

Im Rahmen einer früheren Arbeit (*Ondratschek* 1940) wurden zahlreiche Algenstämme unserer Kulturensammlung auf ihr Vitaminbedürfnis hin untersucht. Dabei zeigte es sich, daß verschiedene mixotrophe Algen keines der gebotenen Vitamine bedurften, sie vermehrten sich in einer vitaminfreien Nährlösung ebenso üppig wie in einer vitaminhaltigen. In der genannten Mitteilung wurde diese Tatsache aber nicht näher untersucht.

Wie *Schopfer* (1939) auf Grund von Versuchen an Pilzen ausführte, kann das Wirkstoffbedürfnis als Zeichen eines Verlustes der Fähigkeit zur Wirkstoffbildung aufgefaßt werden. Aufgabe der mit vorliegender Mitteilung begonnenen Arbeiten ist es, festzustellen, wie weit diese Anschauungen auch für Algen zutreffen. Hier wird als erstes das Vitaminbedürfnis einiger mixotropher Arten untersucht, Versuche über den ertragssteigernden Einfluß von Aneurin auf heterotrophe Algen (= farblose *Flagellaten*) sind im Gange.

Versuchsanstellung.

Zur Herstellung der Nährlösungen wurden durchwegs pro analysi Präparate der Firmen *Merck* und *Schuchardt* verwendet. Die Lösungen wurden mit doppelt — das zweite Mal durch ein Quarzrohr — destilliertem Wasser bereitet. Alle Versuche wurden in *Schott*-Glas Nr. 20 durchgeführt.

Versuche zur Bestimmung des Ernteertrages nach der Zahl der Organismen im cmm wurden in 10 ccm Lösung in Röhrchen angestellt. Versuche, bei denen es auf die Bestimmung der Menge der Trockensubstanz der Ernte ankam, wurden in 250 ccm Lösung in 300 ccm fassenden *Erlenmeyer*-Kolben durchgeführt.

Zur Heranzüchtung des Impfmaterials wurden die betreffenden Stämme in Erdabkochung 1 : 5 herangezogen und immer im Abstand von einigen Tagen frisch überimpft. Von solchen jungen Kulturen wurde jeweils eine Öse voll Zellen zur Beimpfung der einzelnen Versuche verwendet.

Die beimpften Nährlösungen standen z. T. an einer „künstlichen Sonne“, z. T. wurden sie in einem Thermostaten bei 25° C im Dunkeln aufbewahrt.

Die Trockengewichtsbestimmung erfolgte in der üblichen Weise durch Abfiltrieren des Zellgemisches mittels eines Glasfiltertiegels und durch Trocknen bei 105° C bis zur Gewichtskonstanz. Die Angabe des Trockengewichtes erfolgt stets in mg.

Versuche und Ergebnisse.

1. Prüfung von vier Hormidium-Arten auf ihr Vitaminbedürfnis.

Für die folgenden Versuche gelangten nachstehende Algen zur Verwendung: *Hormidium Barlowi* (Stamm 1), *Hormidium flaccidum* (Stamm 2), *Hormidium nitens* und *Hormidium stoechidum*. Zur Prüfung auf ihr Vitaminbedürfnis wurden diese Stämme in folgende Nährlösungen geimpft:

A. Reine Mineralsalzlösung: KNO_3 0,1%, K_2HPO_4 0,001%, $MgSO_4$ 0,001%, $CaCl_2$ 0,0001% und $FeCl_3$ 0,0001%.

a) ohne Vitaminzusatz $p_H = 7,2$;
b) mit 0,0001% Ascorbinsäure $p_H = 7,1$.

B. Nährlösung mit organischer C- und N-Quelle: Na-Acetat 0,2%, Glykokoll 0,1%, K_2HPO_4 0,001%, $MgSO_4$ 0,001%, $CaCl_2$ 0,0001% und $FeCl_3$ 0,0001%.

a) ohne Vitaminzusatz $p_H = 7,1$;
b) mit 0,0001% Ascorbinsäure und 0,0001% Aneurin, $p_H = 7,1$.

C. Die gleiche Nährlösung wie B, jedoch:

a) ohne Vitaminzusatz, $p_H = 7,1$;
b) nur mit 0,0001% Aneurin, $p_H = 7,2$.

Die Versuche mit Nährlösung *A* und *B* kamen ans Licht, mit Lösung *C* ins Dunkle. Nach 20tägiger Versuchsdauer erfolgte die Bestimmung des Trockengewichts, das Ergebnis war:

A. Bei Züchtung am Licht in reiner Mineralsalzlösung (Tabelle I) wurden *Hormidium Barlowi* und *H. stoechidum* durch Ascorbinsäure stark in ihrer Vermehrung gefördert. Ohne Zusatz dieses Wirkstoffes zur Nährlösung vermögen beide Arten nur schlecht zu gedeihen, der Vitaminzusatz bewirkt im ersteren Falle einen 15,6fachen, im zweiten Falle einen 14,6fachen Ernteertrag. *Hormidium flaccidum* und *H. nitens* sprechen hingegen auf Vitaminzusatz nicht an. Sie gedeihen auch in einer vitaminfreien Nährlösung gleich gut wie in einer solchen mit Ascorbinsäurezusatz. Dieser bewirkt bloß einen 1,03- bzw. 1,12fachen Ernteertrag im Vergleich zur Kontrolle ohne Wirkstoff.

Tabelle I. Züchtung von *Hormidium*-Arten in reiner Mineralsalzlösung.

	Nährlösung	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	Faktor
Hormidium Barlowi	Ohne Vitamin ...	4,2	3,9	3,6	3,6	—
	Mit Ascorbinsäure	56,2	59,6	52,7	56,2	15,6
Hormidium flaccidum	Ohne Vitamin ...	56,0	59,2	62,6	59,3	—
	Mit Ascorbinsäure	61,0	59,6	62,5	61,0	1,03
Hormidium nitens	Ohne Vitamin ...	26,9	31,5	24,6	27,7	—
	Mit Ascorbinsäure	32,0	29,8	31,6	31,1	1,12
Hormidium stoechidum	Ohne Vitamin ...	3,0	2,6	3,1	2,9	—
	Mit Ascorbinsäure	41,9	43,1	42,1	42,2	14,6

B. Die Züchtungsversuche in einer Nährlösung mit Acetat und Glykokoll als organische C- und N-Quellen am Licht (Tabelle II) zeigten, daß *Hormidium Barlowi* und *H. stoechidum* auch unter diesen Ernährungsbedingungen zusätzlicher Vitamingaben bedürfen. Die Beigabe von Aneurin und Ascorbinsäure zur Nährlösung bedingt einen 18,9- bzw. 13,2fachen Ernteertrag gegenüber den vitaminfrei gezüchteten Kontrollen. *Hormidium flaccidum* und *H. nitens* gedeihen auch hier wiederum in vitaminhaltigen Nährlösungen ebenso gut wie in vitaminfreien. Der Zusatz von Ascorbinsäure und Aneurin steigert den Ernteertrag bloß auf das 1,12- bzw. 1,15fache.

Tabelle II. Züchtung von *Hormidium*-Arten in einer Nährlösung mit Glykokoll und Acetat am Licht.

	Nährlösung	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	Faktor
Hormidium Barlowi	Ohne Vitamin ...	9,5	10,9	8,4	9,6	—
	Mit Ascorbinsäure und Aneurin ...	184,2	179,6	182,1	181,9	18,9
Hormidium flaccidum	Ohne Vitamin ...	96,8	106,1	99,6	100,8	—
	Mit Ascorbinsäure und Aneurin ...	116,1	109,8	112,2	112,7	1,12
Hormidium nitens	Ohne Vitamin ...	61,2	59,6	64,1	61,6	—
	Mit Ascorbinsäure und Aneurin ...	71,5	69,4	72,1	71,0	1,15
Hormidium stoechidum	Ohne Vitamin ...	15,3	14,6	15,6	15,2	—
	Mit Ascorbinsäure und Aneurin ...	210,6	194,2	198,6	201,1	13,2

C. Bei Verwendung der gleichen Nährlösung mit organischer C- und N-Quelle, jedoch Züchtung im Dunkeln (Tabelle III) liegen die Verhältnisse ähnlich. Wiederum werden *Hormidium Barlowi* und *H. stoechidum* in ihrer Vermehrung durch einen Zusatz von Aneurin wesentlich gefördert (16,7- und 26,2fache Ernte-

erträge), während die beiden anderen *Hormidium*-Arten, *H. flaccidum* und *H. nitens*, durch eine Aneurinbeigabe zur Nährlösung nicht weiter beeinflußt werden. Die Ernteerträge steigen unter dem Einfluß von Aneurin lediglich auf das 1,28- bzw. 1,08fache.

Tabelle III. Züchtung von *Hormidium*-Arten in einer Nährlösung mit Glykokoll und Acetat im Dunkeln.

	Nährlösung	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	Faktor
Hormidium Barlowi	Ohne Vitamin ...	2,6	3,5	2,9	2,9	—
	Mit Aneurin	46,5	42,0	47,2	45,2	16,7
Hormidium flaccidum	Ohne Vitamin ...	23,6	19,3	24,2	22,4	—
	Mit Aneurin	31,0	26,8	28,7	28,8	1,28
Hormidium nitens	Ohne Vitamin ...	19,2	20,6	19,3	19,7	—
	Mit Aneurin	21,2	20,6	22,0	21,3	1,08
Hormidium stoechidum	Ohne Vitamin ...	1,1	1,3	1,4	1,3	—
	Mit Aneurin	36,2	31,2	34,6	34,0	26,2

Es hat sich also gezeigt, daß unter den drei eingerichteten Ernährungsbedingungen, nämlich der Ernährung durch Kohlensäureassimilation allein, der ermöglichten Verwertung von organischen Stoffen neben Kohlensäure und schließlich der Ernährung mittels ausschließlich organischer Kohlenstoff- und Stickstoff-Quellen, zwei der geprüften *Hormidium*-Arten, nämlich *H. flaccidum* und *H. nitens*, eines Vitaminzusatzes nicht bedürfen bzw. auf einen solchen nicht ansprechen, also vermutlich imstande sind, die Vitaminsynthese selbständig durchführen zu können. Diese beiden Arten liefern bei Züchtung in einer vitaminfreien Nährlösung die gleichen Ernteerträge wie bei Züchtung in einer vitaminhaltigen. Die beiden anderen Arten, *H. Barlowi* und *H. stoechidum*, werden hingegen durch eine zusätzliche Vitaminbeigabe zur Nährlösung wesentlich in ihrer Vermehrung gefördert, sie müssen als „vitaminbedürftig" angesprochen werden.

2. *Ertragsteigernde Wirkung von Extrakten vitamin-nichtbedürftiger Arten.*

Wenn die Ansicht richtig ist, daß das Vitaminbedürfnis auf einen Verlust der Fähigkeit zur Synthese des betreffenden Stoffes zurückzuführen ist, dann müssen Extrakte von Kulturen solcher Arten, deren Vermehrung unabhängig vom Vitamingehalt der Nährlösung ist, vermehrungsfördernd auf diejenigen Stämme wirken, die auf eine zusätzliche Vitaminbeigabe angewiesen sind, und zwar mindest in gleich starkem Maße wie ein zugesetztes, synthetisches Vitamin.

Zur Prüfung dieser Frage wurde folgendermaßen vorgegangen: In je fünf Kolben mit 250 ccm vitaminfreier Nährlösung *A*, *B* und *C* (Zusammensetzung auf S. 229) wurden *Hormidium flaccidum* und *H. nitens* herangezogen und

nach 20tägiger Kultur wurde der Inhalt je eines Kolbens dazu verwendet, um das Frisch- und Trockengewicht zu bestimmen. Diese Bestimmungen sollten einen beiläufigen Anhaltspunkt dafür geben, welche Mengen an Ausgangsmaterial für die Herstellung der Extrakte zur Verfügung standen. Der Inhalt der jeweils vier weiteren Kolben wurde in einer Reibschale mit feinstem Quarzsand (*Merck*, pro analysi) gründlich zerrieben, mit ungefähr 10 ccm Wasser aufgenommen und bei Zimmertemperatur in einem verschlossenen Gefäß 3 Stunden stehen gelassen. Dann wurden die Extrakte filtriert und auf 100 ccm aufgefüllt. Von diesen Stammlösungen wurde jeweils 1 ccm zu 100 ccm Nährlösung zugefügt. Auf die chemische Bestimmung der in diesen Extrakten enthaltenen Vitamine wird weiter unten näher eingegangen.

Zur Kennzeichnung der Extrakte sei noch folgendes mitgeteilt:

Hormidium flaccidum-Extrakte.

1. Stammlösung (H. F. I). In insgesamt 1000 ccm reiner Mineralsalzlösung wurde in 20tägiger Kultur 2,7 g Frischsubstanz, entsprechend 0,26 g Trockengewicht, erzeugt.

2. Stammlösung (H. F. II). In 1000 ccm einer Nährlösung mit Acetat und Glykokoll wurde bei Züchtung am Licht 4,1 g Frisch- = 0,43 g Trockensubstanz hervorgebracht.

3. Stammlösung (H. F. III). In 1000 ccm der gleichen Lösung, jedoch bei Züchtung im Dunkeln, wurden 1,4 g Frischgewicht bzw. 0,15 g Trockensubstanz bestimmt.

Hormidium nitens-Extrakte.

1. Stammlösung (H. N. I). Hergestellt aus 1,3 g Frisch- = 0,14 g Trockensubstanz, herangezüchtet in reiner Mineralsalzlösung.

2. Stammlösung (H. N. II). Bereitet aus 3,2 g Frisch- bzw. 0,33 g Trockensubstanz, gezüchtet in einer Lösung mit Acetat und Glykokoll am Licht.

3. Stammlösung (H. N. III). Ausgangsmaterial herangezüchtet in einer Lösung mit Acetat und Glykokoll im Dunkeln. Frischgewicht der zur Verfügung stehenden Menge 1,0 g, Trockengewicht 0,09 g.

Zur Durchführung der eigentlichen Versuche wurden wiederum die gleichen, bereits auf S. 229 angegebenen Nährlösungen, und zwar: eine reine Mineralsalzlösung bei Züchtung am Licht, eine Nährlösung mit Acetat und Glykokoll bei Züchtung am Licht und im Dunkeln, mit den vier *Hormidium*-Arten beimpft. Je drei Kolben blieben ohne weiteren Zusatz zur Kontrolle, je drei weitere Kolben erhielten Vitaminzusätze, und zwar in der bisherigen Weise die Mineralsalzlösung 0,0001 % Ascorbinsäure, die Lösung mit organischer C- und N- Quelle bei Züchtung am Licht 0,0001 % Ascorbinsäure und 0,0001 % Aneurin, bei Züchtung im Dunkeln 0,0001 % Aneurin, eine weitere Partie von je drei Kolben wurde mit je 1 Vol.-% der *Hormidium flaccidum*-Stammlösungen, eine vierte Partie von je drei Kolben mit je 1 Vol.-% der *Hormidium nitens*-Stammlösungen versehen, und zwar derart, daß der reinen Mineralsalz-

lösung die Extrakte H. F. I bzw. H. N. I, der Lösung mit Glykokoll und Acetat, bei Lichtkulturen die Extrakte H. F. II bzw. H. N. II und bei Züchtung im Dunkeln die Extrakte H. F. III bzw. H. N. III zugesetzt wurden.

Nach Abschluß der Versuchsreihen und erfolgter Trockengewichtsbestimmung zeigte es sich, daß die betreffenden *Hormidium*-Extrakte bei Anwendung auf die Arten *H. Barlowi* und *H. stoechidum* in allen Fällen nahezu die gleiche vermehrungssteigernde Wirkung ausübten wie die in den Parallelversuchen zugesetzten Vitamine (Tabelle IV, V, VI). Auf *H. flaccidum* und *H. nitens* haben jedoch deren eigene Extrakte ebenso wie zugesetzte, synthetische Vitamine keine fördernde Wirkung gezeigt.

Es ist damit also nachgewiesen, daß die beiden Stämme *Hormidium flaccidum* und *H. nitens* die gleichen Wirkstoffe zu erzeugen imstande sind, welche von den beiden anderen *Hormidium*-Arten, *H. Barlowi* und *H. stoechidum*, benötigt werden. Ferner ist damit nachgewiesen, daß das Vitaminbedürfnis der beiden letzten Arten tatsächlich auf einen Verlust der Synthesefähigkeit zurückzuführen ist, falls man nicht das Unwahrscheinlichere annehmen will, daß nämlich die beiden ersten Stämme diese Fähigkeit neu erworben haben, während die beiden anderen dazu noch nicht imstande sind.

Tabelle IV. Züchtung von *Hormidium*-Arten in reiner Mineralsalzlösung unter Beigabe von Extrakten vitamin-nichtbedürftiger Arten.

	Nährlösung	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	Faktor
Hormidium Barlowi	Ohne Zusatz	3,6	2,9	3,1	3,2	—
	Mit Ascorbinsaure ..	56,6	61,0	56,2	57,9	18,1
	„ Extrakt H. F. I	60,2	59,6	56,0	58,6	18,3
	„ „ H. N. I	62,8	61,2	62,1	62,0	19,4
Hormidium flaccidum	Ohne Zusatz	58,2	60,3	59,4	59,3	—
	Mit Ascorbinsäure ..	60,2	61,2	59,9	60,4	1,02
	„ Extrakt H. F. I	58,6	59,6	62,0	60,1	1,01
	„ „ H. N. I	62,0	61,1	60,5	61,2	1,03
Hormidium nitens	Ohne Zusatz	25,6	26,4	26,1	26,0	—
	Mit Ascorbinsäure ..	28,6	29,5	30,6	29,6	1,14
	„ Extrakt H. F. I	27,5	28,3	25,4	27,1	1,04
	„ „ H. N. I	28,9	32,4	31,0	30,8	1,18
Hormidium stoechidum	Ohne Zusatz	2,6	2,9	2,4	2,6	—
	Mit Ascorbinsäure ..	45,6	49,2	44,2	46,3	17,8
	„ Extrakt H. F. I	48,2	46,0	50,6	48,3	18,6
	„ „ H. N. I	50,1	49,2	43,9	44,4	17,1

Tabelle V. Züchtung von *Hormidium*-Arten in einer Nährlösung mit Glykokoll und Acetat am Licht unter Beigabe von Extrakten vitamin-nichtbedürftiger Arten.

	Nährlösung	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	Faktor
Hormidium Barlowi	Ohne Zusatz	8,4	7,6	8,6	8,2	—
	Mit Ascorbinsäure und Aneurin	172,0	168,9	169,7	170,2	20,8
	Mit Extrakt H. F. II	180,6	178,9	172,1	177,2	21,6
	„ „ H. N. II	169,2	168,2	170,5	169,3	20,6
Hormidium flaccidum	Ohne Zusatz	102,0	98,6	103,6	101,4	—
	Mit Ascorbinsäure und Aneurin	110,2	109,6	108,2	109,3	1,08
	Mit Extrakt H. F. II	100,2	102,6	104,2	102,3	1,01
	„ „ H. N. II	99,8	102,4	99,6	100,6	0,99
Hormidium nitens	Ohne Zusatz	62,0	59,6	58,2	59,9	—
	Mit Ascorbinsäure und Aneurin	69,2	71,5	68,4	69,7	1,16
	Mit Extrakt H. F. II	62,5	61,0	59,6	61,0	1,02
	„ „ H. N. II	62,0	64,2	63,7	63,3	1,06
Hormidium stoechidum	Ohne Zusatz	15,2	14,9	16,0	15,4	—
	Mit Ascorbinsäure und Aneurin	216,2	210,6	224,1	216,9	14,1
	Mit Extrakt H F. II	221,9	215,6	218,6	218,7	14,2
	„ „ H. N. II	208,2	220,2	216,8	215,1	14,0

Tabelle VI. Züchtung von *Hormidium*-Arten in einer Nährlösung mit Glykokoll und Acetat im Dunkeln unter Beigabe von Extrakten vitamin-nichtbedürftiger Arten.

	Nährlösung	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	Faktor
Hormidium Barlowi	Ohne Zusatz	2,0	1,6	2,4	2,0	—
	Mit Aneurin	46,8	50,6	51,0	49,5	24,8
	„ Extrakt H. F. III	52,6	49,6	50,2	50,8	25,0
	„ „ H. N. III	52,2	53,6	51,9	52,6	26,3
Hormidium flaccidum	Ohne Zusatz	24,5	21,2	23,6	23,1	—
	Mit Aneurin	26,9	28,4	28,0	27,8	1,21
	„ Extrakt H. F. III	25,0	24,6	28,4	26,0	1,15
	„ „ H. N. III	22,2	24,2	23,1	23,2	1,00
Hormidium nitens	Ohne Zusatz	19,0	18,6	18,9	18,8	—
	Mit Aneurin	21,0	18,9	19,6	19,8	1,05
	„ Extrakt H. F. III	20,4	21,6	19,5	20,5	1,09
	„ „ H. N. III	21,2	22,9	20,6	21,6	1,15
Hormidium stoechidum	Ohne Zusatz	1,2	1,5	0,9	1,2	—
	Mit Aneurin	29,8	32,5	34,0	32,1	26,8
	„ Extrakt H. F. III	35,8	32,0	31,9	33,2	27,7
	„ „ H. N. III	30,2	35,6	31,1	32,3	27,1

3. *Einfluß von Extrakten vitamin-bedürftiger Stämme.*

Im Anschluß an die im vorhergehenden Abschnitt geschilderten Versuche schien es notwendig zu untersuchen, ob Extrakte von Stämmen,

die durch Vitaminbeigaben zur Nährlösung wesentlich in ihrer Vermehrung gefördert werden, ebenfalls Einfluß auf die Vermehrung haben.

Die Versuchsanstellung entsprach ganz der im vorigen Abschnitt geschilderten, doch wurden zur Heranzüchtung des Ausgangsmaterials je zehn Kolben mit den vitaminfreien Nährlösungen *A*, *B* und *C* (s. S. 229) beimpft, da hier bedeutend niedrigere Ernteerträge zu erwarten waren, als bei den vorangegangenen Versuchen. Wie vorher wurde auch hier nach 20 Versuchstagen in je 1 Kolben das Frisch- und Trockengewicht bestimmt und der Inhalt der je restlichen neun Kolben zur Bereitung der Extrakte in der angegebenen Weise verwendet.

Hormidium Barlowi-Extrakte.

1. Stammlösung (H. B. I). Ausgangsmaterial in reiner Mineralsalzlösung herangezüchtet, Frischgewicht 0,29 g, Trockengewicht 0,026 g.

2. Stammlösung (H. B. II). Zur Verfügung standen 0,71 g Frisch- = 0,068 g Trockensubstanz, herangezüchtet in einer Nährlösung mit Glykokoll und Acetat am Licht.

3. Stammlösung (H. B. III). Bereitet aus 0,18 g Frisch- bzw. 0,016 g Trockensubstanz, herangezüchtet mit Glykokoll und Acetat in Dunkelkulturen.

Hormidium stoechidum-Extrakte.

1. Stammlösung (H. S. I). Bereitet aus 0,24 g Frisch- bzw. 0,02 Trockensubstanz. Die Züchtung erfolgte in reiner Mineralsalzlösung.

2. Stammlösung (H. S. II). Ausgangsmaterial in Lichtkulturen mit Glykokoll und Acetat herangezüchtet. Zur Verfügung standen 1,21 g Frisch- = 0,11 g Trockengewicht.

3. Stammlösung (H. S. III). Hergestellt aus 0,19 g Frischsubstanz, entsprechend 0,02 g Trockengewicht. Die Züchtung erfolgte in einer Nährlösung mit Glykokoll und Acetat im Dunkeln.

Die eigentlichen Versuche wurden wiederum in der auf S. 229 geschilderten Weise mittels der Nährlösungen *A*, *B* und *C* angestellt, wobei folgende Zusätze zu den einzelnen Lösungen kamen: Je eine Gruppe von drei Kolben erhielt Vitaminbeigaben, und zwar in der bisher üblichen Weise die Mineralsalzlösung 0,0001 % Ascorbinsäure, die Lösung mit Glykokoll und Acetat bei Züchtung am Licht 0,0001 % Ascorbinsäure und 0,0001 % Aneurin, bei Züchtung im Dunkeln bloß 0,0001 % Aneurin, eine weitere Gruppe von je drei Kolben erhielt je Kolben 1 Vol.-% der *Hormidium Barlowi*-Extrakte (H. B. I bis III), eine dritte Gruppe von je drei Kolben die entsprechenden Extrakte von *Hormidium stoechidum* (H. S. I bis III) gleichfalls je 1 Vol.-% und eine vierte Gruppe zu je drei Kolben blieb ohne weiteren Zusatz. Die Beimpfung erfolgte mit allen vier *Hormidium*-Arten.

Die Versuche standen durch 20 Tage z. T. an einer künstlichen Sonne, z. T. im Thermostaten bei 25° C. Die nach 20 Versuchstagen durchgeführten Trockengewichtsbestimmungen hatten durchwegs das gleiche Ergebnis. In allen Fällen waren die Extrakte der vitamin-

bedürftigen Arten unwirksam. Die Zugaben dieser Extrakte zu den verwendeten Nährlösungen zeitigten im Vergleich zur Kontrolle ohne jeden Zusatz keinerlei erhöhten Ernteertrag. Die Vitamin enthaltenden Vergleichsversuche ergaben in der bisherigen Weise einen rund 18 fach erhöhten Ernteertrag. Sämtliche Ergebnisse sind in den Tabellen VII, VIII und IX zusammengestellt.

Tabelle VII. Züchtung von *Hormidium*-Arten in einer reinen Mineralsalzlösung unter Beigabe von Extrakten vitaminbedürftiger Arten.

	Nährlösung	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	Faktor
Hormidium Barlowi	Ohne Zusatz	3,2	2,9	3,9	3,3	—
	Mit Ascorbinsäure ..	62,0	61,0	60,2	61,1	18,5
	„ Extrakt H. B. I	2,9	2,6	3,2	2,9	0,88
	„ „ H. S. I	3,2	2,8	3,1	3,0	0,91
Hormidium flaccidum	Ohne Zusatz	60,2	59,3	59,8	59,8	—
	Mit Ascorbinsäure ..	61,2	59,6	60,2	60,3	1,01
	„ Extrakt H. B. I	59,8	56,9	62,4	59,7	1,00
	„ „ H. S. I	62,0	60,2	59,1	60,4	1,01
Hormidium nitens	Ohne Zusatz	26,8	27,5	25,9	26,7	—
	Mit Ascorbinsäure ..	28,6	29,2	31,0	29,6	1,12
	„ Extrakt H. B. I	26,8	27,5	27,9	27,4	1,03
	„ „ H. S. I	27,5	29,0	28,1	28,2	1,06
Hormidium stoechidum	Ohne Zusatz	2,6	1,9	3,2	2,6	—
	Mit Ascorbinsänre ..	46,0	44,9	45,6	44,2	17,0
	„ Extrakt H. B. I	3,0	3,8	2,6	3,1	1,19
	„ „ H. S. I	3,6	3,2	4,0	3,6	1,38

Tabelle VIII. Züchtung von *Hormidium*-Arten in einer Nährlösung mit Glykokoll und Acetat am Licht unter Beigabe von Extrakten vitamin-bedürftiger Arten.

	Nährlösung	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	Faktor
Hormidium Barlowi	Ohne Zusatz	7,9	7,6	8,2	7,9	—
	Mit Ascorbinsäure und Aneurin	180,6	179,4	178,6	179,5	22,7
	Mit Extrakt H. B. II	8,5	8,6	8,1	8,4	1,06
	„ „ H. S. II	8,0	7,9	8,4	8,1	1,02
Hormidium flaccidum	Ohne Zusatz	98,7	99,2	101,0	99,6	—
	Mit Ascorbinsäure und Aneurin	109,9	97,8	101,3	100,0	1,00
	Mit Extrakt H. B. II	97,2	99,6	98,1	98,3	0,99
	„ „ H. S. II	96,2	99,4	99,8	98,5	0,99
Hormidium nitens	Ohne Zusatz	58,9	60,2	59,2	59,4	—
	Mit Ascorbinsäure und Aneurin	62,8	63,2	59,6	61,9	1,04
	Mit Extrakt H. B. II	58,6	61,2	60,9	60,2	1,01
	„ „ H. S. II	63,5	62,1	62,6	62,7	1,06

Tabelle VIII (Fortsetzung).

	Nährlösung	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	Faktor
Hormidium stoechidum	Ohne Zusatz	14,2	13,6	14,0	13,9	—
	Mit Ascorbinsäure und Aneurin	246,0	220,9	235,8	234,2	16,9
	Mit Extrakt H. B. II	15,0	14,9	14,7	14,9	1,07
	„ „ H. S. II	14,6	16,0	15,4	15,3	1,10

Tabelle IX. Züchtung von *Hormidium*-Arten in einer Nährlösung mit Glykokoll und Acetat im Dunkeln unter Beigabe van Extrakten vitamin-bedürftiger Arten.

	Nährlösung	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	Faktor
Hormidium Barlowi	Ohne Zusatz	2,6	1,5	2,2	2,1	—
	Mit Aneurin	50,8	50,1	51,1	50,7	24,0
	„ Extrakt H. B. III	3,0	2,6	3,1	2,9	1,38
	„ „ H. S. III	2,6	2,8	2,4	2,6	1,24
Hormidium flaccidum	Ohne Zusatz	20,6	21,3	19,7	20,5	—
	Mit Aneurin	26,4	24,9	25,6	25,6	1,25
	„ Extrakt H. B. III	24,2	21,0	19,5	21,6	1,05
	„ „ H. S. III	20,9	22.1	21,6	21,5	1,05
Hormidium nitens	Ohne Zusatz	20,6	21,6	21,3	21,2	—
	Mit Aneurin	22,4	23,6	21,9	22,6	1,06
	„ Extrakt H. B. III	22,0	19,2	18,9	20,0	0,94
	„ „ H. S. III	21,2	20,6	21,8	21,2	1,00
Hormidium stoechidum	Ohne Zusatz	1,6	1,2	1,5	1,4	—
	Mit Aneurin	36,2	34,9	35,8	35,6	25,4
	„ Extrakt H. B. III	1,9	2,2	1,6	1,9	1,26
	„ „ H. S. III	2,4	2,1	1,6	2,0	1,54

4. Chemische Bestimmungen der Ascorbinsäure und des Aneurins in den einzelnen Hormidium-Extrakten.

Die Bestimmung von Vitamin B_1 erfolgte kolorimetrisch mit dem Formaldehydazo-Test nach *H. Kinnersley* und *R. Peters*, die Bestimmung der Ascorbinsäure durch Titration mit Methylenblau nach *E. Martini* und *A. Bonsignore*. Beide Methoden wurden nach der

Tabelle X.
Ascorbinsäure- und Aneuringehalt von *Hormidium*-Extrakten. Bezogen auf 1 g Trockensubstanz. Vitamingehalt in γ.

Extrakt	Aneurin	Ascorbinsäure	Extrakt	Aneurin	Ascorbinsäure
H. F. I	12,2	68,5	H. B. I	8,2	26,4
H. F. II	26,2	65,8	H. B. II	19,2	22,5
H. F. III	29,8	8,4	H. B. III	31,5	18,2
H. N. I	6,4	49,3	H. S. I	10,2	29,8
H. N. II	34,2	48,8	H. S. II	26,2	25,6
H. N. III	42,6	10,1	H. S. III	28,8	12.4

Vorschrift von *F. Gstirner* (1939) durchgeführt. Die Berechnung erfolgte auf je 1 g Trockensubstanz. Die Ergebnisse sind in Tabelle X zusammengestellt.

Zu vorstehender Tabelle X sei bemerkt, daß die angegebenen Werte durchaus keinen Anspruch auf Allgemeingültigkeit erheben können. Der Vitamingehalt des Zellsaftes ist von einer ganzen Reihe von Faktoren abhängig, so daß sich die hier gefundenen Werte lediglich auf die oben beschriebenen, im Laufe dieser Arbeit bereiteten Extrakte beziehen und nicht absolute Angaben darstellen.

Zusammenfassung.

Es wurde gezeigt, daß das Vitaminbedürfnis gewisser Algen (*Hormidium*-Arten) tatsächlich auf den Verlust der Fähigkeit, Vitamine selbst synthetisieren zu können, zurückgeführt werden kann. Ein Zusatz von Extrakten vitamin-nichtbedürftiger Arten zu Kulturen vitamin-bedürftiger Stämme hat die gleiche ertragsteigernde Wirkung wie ein Zusatz synthetischer Vitamine. Zusätze von Extrakten vitaminbedürftiger Stämme haben keinerlei vermehrungsfördernde Wirkung.

Literatur.

Gstirner, F., Chemische Vitamin-Bestimmungsmethoden. Stuttgart 1939. — *Kinnersley, H.*, u. *R. Peters*, Biochem. Journ. **28**, 667, 1934; **29**, 2369, 1935; **32**, 1516, 1938. — *Martini, E.*, u. *A. Bonsignore*, Biochem. Zeitschr. **278**, 170, 1934. — *Ondratschek, K.*, diese Zeitschr. **11**, 89, 1940. — *Schopfer, W. H.*, Ergebnisse der Biologie **16**, 1, 1939.

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Deutschen Karls-Universität in Prag.)

Über das Wirkstoffbedürfnis heterotropher Algen.

I. Mitteilung:

Aneurin als Wachstumsfaktor für Chilomonas paramaecium.

Von

Karl Ondratschek.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 7. Juni 1940.)

Die Fortschritte der Chemie in der Synthetisierung gewisser organischer Verbindungen haben es ermöglicht, mit reinsten, zum Teil synthetischen Wirkstoffpräparaten — vor allem mit Vitaminen — an die Untersuchung einer Reihe von Faktoren herantreten zu können, die teils eine bedeutende Steigerung der Trockensubstanzproduktion, teils aber überhaupt erst die Ausnutzung chemisch einfach genauter Energie- und Baustoffquellen durch die verschiedensten heterotrophen Mikroorganismen ermöglichen.

Neben zahlreichen Untersuchungen an *Bakterien* (*Knight* 1933, 1935, 1937 u. a.) hat vor allem *Schopfer* (1932 usf.) an verschiedenen Pilzen und *Nielsen* (1930 usf.) an *Hefe* und *Aspergillus* wichtige Feststellungen über die Rolle der Vermehrungsfaktoren in der Ernährungsphysiologie dieser Arten getroffen. Eine sehr übersichtliche Zusammenstellung der bisherigen Ergebnisse auf dem Gebiete der Wirkstofforschung hat *Schopfer* (1939) gegeben, eine weitere, nach anderen Gesichtspunkten zusammengestellte Übersicht veröffentlichte *Janke* (1939). Beide Arbeiten lassen ein näheres Eingehen auf die bisherigen Arbeiten an dieser Stelle als unnötig erscheinen, soweit nicht ein solches bei einzelnen Versuchsreihen geboten erscheint.

Nach einem Vorschlag *Schopfers* (1939, S. 17) können wir alle Wirkstoffe in folgendes System bringen:

Wirkstoffe:

Pseudowachstumsfaktoren: mineralischer Natur;

Wachstumsfaktoren: vitaminischer Natur, greifen in den Stoffwechsel ein, wirken u. a. auf die Assimilierbarkeit der Nährstoffe und den Plasmawuchs;

Wuchsstoffe: hormonartiger Natur, beeinflussen in letzter Instanz auf spezifische Weise die Formbildung.

Die einleitend genannten Untersuchungen von *Schopfer* und *Nielsen* beschäftigten sich durchwegs mit der Wirkung von Stoffen oder Extrakten, die zur Gruppe der Wachstumsfaktoren gerechnet werden müssen. Über deren Bedeutung für das Zellgeschehen von Algen ist noch wenig bekannt. *Ondratschek* konnte (1940) die Rolle der Ascorbin-

säure und des Aneurins als ertragssteigernde Faktoren für mixotrophe Grünalgen aufzeigen; über den vermehrungsfördernden Einfluß von Wirkstoffen auf heterotrophe Algen liegen lediglich einige kurze Mitteilungen von *Lwoff* und seinen Mitarbeitern (1935, 1937, 1938) vor, die für einige *farblose Flagellaten* (Leucophyten) Aneurin bzw. dessen Bausteine Thiazol und Pyrimidin als Wachstumsfaktoren feststellten. Diese Mitteilungen lassen infolge ihrer Kürze jegliche Einzelheiten vermissen; für die Nachprüfung wichtige Angaben, wie Zusammensetzung der Nährlösung oder Konzentration des Aneurins, sind nur unvollkommen bzw. überhaupt nicht vorhanden. Ebenso fehlen jegliche quantitative Bestimmungen der Aneurinwirkung. Dies ließ es in Anbetracht der Bedeutung des Wirkstoffproblems als notwendig erscheinen, eingehende Versuche über das Wirkstoffbedürfnis heterotropher Algen anzustellen. Als erster Beitrag zu der mit vorliegender Mitteilung begonnenen Reihe von Arbeiten wird das Ergebnis der Untersuchungen über die Bedeutung des Aneurins als Wachstumsfaktor für *Chilomonas paramaecium* vorgelegt.

An dieser Stelle seien einige Bemerkungen über die sprachlich zweckmäßigste Bezeichnung des Einflusses eines Wirkstoffs angefügt. In zahlreichen Arbeiten finden sich die verschiedensten Angaben, wie „stimulierend", „anregend", „wachstumsfördernd", „vermehrungsanregend", „ertragssteigernd" u. a. m. Begriffe, wie „stimulierend" oder „anregend", sind als wenig kennzeichnend von vorneweg abzulehnen. Beim Gebrauch der übrigen sprachlichen Ausdrücke empfiehlt es sich, folgende Unterscheidung vorzunehmen:

1. In jenen Fällen, da der betreffende Wirkstoff unumgänglich notwendig ist, sein Fehlen in einer sonst optimalen Nährlösung keinerlei Vermehrung zuläßt, soll nur der Begriff „Wachstumsfaktor" (im engeren Sinne) gebraucht werden.

2. Falls der zu untersuchende Stoff eine an sich zwar vorhandene, jedoch mehr oder minder geringe Vermehrung bedeutend steigert, also einen Wachstumsfaktor im weiteren Sinne darstellt, empfiehlt es sich, seine Wirkung mit „vermehrungsanregend" oder „ertragssteigernd" zu bezeichnen. Der Begriff „wachstumsfördernd" hat nur dann seine Berechtigung, wenn tatsächlich festgestellt wurde, daß das Wachstum, also die irreversible Volumenzunahme der *einzelnen Zelle*, unter dem Einfluß des geprüften Stoffes eingetreten ist.

Diese Bemerkungen beziehen sich nur auf die *sprachliche* Bezeichnung der genannten Fälle; es sei betont, daß *physiologisch* zwischen beiden kein grundsätzlicher Unterschied besteht. Im ersten Falle haben die betreffenden Organismen die Fähigkeit zur Bildung des betreffenden Wirkstoffs vollständig eingebüßt, im zweiten Falle jedoch nur teilweise.

Versuchsanstellung.

Zur Bereitung der in vorliegender Arbeit verwendeten Nährlösungen — ihre Zusammensetzung wird bei den einzelnen Versuchsreihen angegeben — gelangten durchwegs Präparate der Firmen *Merck*, *Kahlbaum*, *Fränkel* u. *Landau* und *Schuchardt* mit der Bezeichnung „pro analysi" oder „purissimum" zur Verwendung, das Aneurin ist ein Erzeugnis der I. G. Farben-Werke („*Bayer*"). Die Zubereitung der Lösungen erfolgte mit doppelt — das zweite Mal durch ein Quarzrohr — destilliertem Wasser, entkeimt wurde durch kurzes Erhitzen auf 120° C im Autoklaven.

Die Versuche wurden zum Teil in Röhrchen in 10 ccm Lösung, zum Teil in 250 ccm Lösung in 300 ccm fassenden *Erlenmeyer*-Kolben angesetzt. Zur Verwendung gelangte ausschließlich Jenaer Geräteglas Nr. 20. Zum Verschluß der Kulturgefäße konnte nach früheren Feststellungen (*Schopfer* 1937, *Ondratschek* 1940) die übliche, nicht entfettete Watte nicht gebraucht werden, da diese bei der Sterilisation eine gewisse Wirkstoffmenge an die Lösung abgibt. Anfängliche Versuche wurden daher mit einem Verschluß von entfetteter, besonders gereinigter (sogenannter „medizinischer") Watte versehen, später gelangte vorwiegend Zellstoff zur Verwendung.

Der zur Verwendung gelangte *Chilomonas*-Stamm wurde aus Schlamm mit faulenden Blättern eines Baches am Rande von Werschowitz (Prag) zuerst mittels Faulkultur in Käse-Erde-Röhrchen in Rohkultur und später durch wiederholtes Waschen einzelner Zellen mit steriler Erdabkochung in bakterienfreier Klonkultur gewonnen. Er wurde in regelmäßigen Abständen von 5 bis 6 Tagen überimpft, von solchen frischen, meist 3 Tage alten Kulturen wurden dann die einzelnen Versuche mit je 1 Tropfen einer derart bereiteten Zellaufschwemmung beimpft, daß sich im Tropfen rund 20 Zellen befanden. Die beimpften Nährlösungen wurden in einem Thermostaten bei 25° C aufbewahrt.

Die quantitative Bestimmung der Ernteerträge erfolgte bei den in 10 ccm Nährlösung durchgeführten Versuchen durch Feststellung der Individuenzahl in der Volumeneinheit, bei den in größerer Flüssigkeitsmenge angestellten Versuchen durch Trockengewichtsbestimmung des abfiltrierten Zellgemisches. Nähere Einzelheiten über beide Methoden siehe *Ondratschek* 1940, S. 90—91).

Die Angabe der Erträge erfolgt stets in mg Trockengewicht (T), wo in den Kontrollversuchen eine Vermehrung festzustellen war, ferner durch Angabe des Vermehrungsfaktors (f), welcher das Verhältnis zwischen der mit Aneurinzusatz erzielten Erntemenge und der im vitaminfreien Kontrollversuch erhaltenen kennzeichnet.

Eigene Untersuchungen und ihre Ergebnisse.

A. Vorversuche.

1. Einfluß des physiologischen Zustandes des zur Beimpfung verwendeten Zellgemisches auf das Versuchsergebnis.

Theoretische Überlegungen und praktische Erfahrungen (*Czurda* 1935, *Ondratschek* 1936, 1940) ließen es zweckdienlich erscheinen, eigene Versuche anzustellen, um den Einfluß des physiologischen Zustandes des für einen Versuch verwendeten Impfmaterials auf den Versuchsverlauf und auf das Ergebnis festzustellen. Bei *Zygnemalen* und *Chlamy-*

domonaden hat *Czurda* (1933, 1935) bei *Desmidiaceen Ondratschek* (1936) aufgezeigt, daß nur die Verwendung eines in intensivster Vermehrung stehenden, in morphologischer, wie physiologischer Hinsicht völlig gleichartigen Ausgangszellgemisches wiederholbare Ergebnisse verbürgt. Es war daher die naheliegendste Aufgabe, festzustellen, in welchem Maße die eben aufgezeigten Befunde an verschiedenen Algengruppen auch für *farblose Flagellaten* zutreffen. Unter Berücksichtigung des in vorliegender Mitteilung behandelten Problems war es in erster Linie hier notwendig, experimentell zu untersuchen, welchen Einfluß der physiologische Zustand des zur Beimpfung verwendeten Zellgemisches — gekennzeichnet durch die Intensität der Vermehrung und durch den Grad der Gleichartigkeit — auf die Höhe des Ernteertrags nimmt.

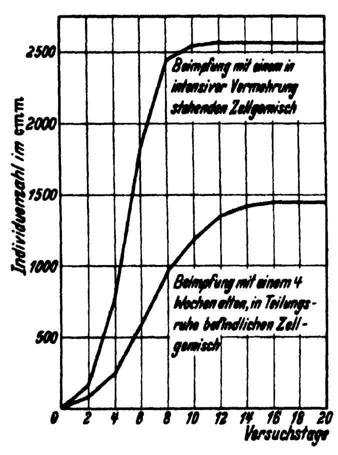


Abb. 1. Einfluß des physiologischen Zustandes des Impfmateriales auf die Zunahme der Zellen im cmm bei *Chilomonas paramaecium*.

Dazu wurde die im hiesigen Institut zur Züchtung farbloser Flagellaten ständig verwendete Nährlösung N 25a (Zubereitung: in 10%iger Erdabkochung werden 0,1% Pepton Vaillant und 0,2% Natriumacetat gelöst) einmal mit Zellen aus einem 4 Wochen alten, weitgehend in Teilungsruhe befindlichen Zellgemisch, das andere Mal mit Zellen aus einer Kultur, die durch 4 Wochen hindurch jeden dritten Tag in neue Nährlösung übertragen worden war, beimpft und im Abstand von je 2 Tagen die Zahl der Zellen im cmm bestimmt. Jeder Versuch wurde in fünf Röhrchen durchgeführt, die ganze Versuchsreihe insgesamt viermal wiederholt.

Schon im Verlaufe der ersten Versuchstage zeigte sich (Abb. 1) eine viel stärkere Vermehrung bei Verwendung des durch vier Wochen hindurch jeden dritten Tag überimpften Ausgangsmaterials als bei Beimpfung mit einem relativ degenerierten Zellgemisch. Dieser Unterschied verstärkte sich im weiteren Verlauf der Versuchsreihe immer mehr und nach Beendigung des Versuchs konnte im ersten Falle eine fast doppelt so große Zellendichte im cmm festgestellt werden als im zweiten. Dies Ergebnis zeigt, daß auch bei Arbeiten mit der Gruppe der farblosen Flagellaten, die bei anderen Algengruppen bereits aufgezeigten Bedingungen, nämlich die Verwendung eines in intensivster Vermehrung stehenden Zellgemisches zur Beimpfung, berücksichtigt werden müssen, um jederzeit wiederholbare Ergebnisse hervorzubringen.

Im Anschluß an die eben geschilderten Versuche schien es geboten, in ähnlicher Weise darüber Versuche anzustellen, inwieweit ein ursprünglich in Teilungsruhe befindliches, weitgehend degeneriertes Zell-

gemisch durch wiederholtes Übertragen in frische Nährlösung seinen physiologischen Zustand — gekennzeichnet vor allem durch die Vermehrungsintensität — ändert.

Zu diesem Zweck wurde mittels der gleichen Nährlösung N 25a ein 4 Wochen altes Zellgemisch durch fünf Passagen zu je 6 Tagen überimpft und fortlaufend die Zunahme der Zellenzahl im cmm bestimmt. Die Versuche wurden in je fünf Röhrchen vorgenommen und einmal wiederholt.

Tabelle I. Steigerung der Vermehrungsintensität von *Chilomonas paramaecium* durch wiederholtes Übertragen in frische Nährlösung.

Versuchstage	Zahl der Zellen im cmm – Passagen					Versuchstage	Zahl der Zellen im cmm – Passagen				
	1.	2.	3.	4.	5.		1.	2.	3.	4.	5.
2	45	100	89	162	126	12	1420	1780	2150	2480	2600
4	180	331	528	750	892	14	1490	1810	2150	2470	2590
6	640	745	1110	1560	2280	16	1480	1820	2170	2480	2580
8	1050	1180	1830	2400	2580	18	1490	1825	2165	2470	2565
10	1340	1620	2140	2480	2590	20	1480	1810	2160	2470	2570

Die in Tabelle I dargestellten Ergebnisse zeigen, daß, wie dies für andere Organismen bereits bekannt ist, auch ein Vertreter der farblosen Flagellaten durch wiederholtes Übertragen in frische Nährlösung seinen physiologischen Zustand, der anfänglich weit in der Degenerationsphase befindlich war, nach und nach dergestalt ändert, daß das Zellengemisch immer einheitlicher wird, wobei die Vermehrungsintensität ständig zunimmt. Nach vier- bis fünfmaliger Übertragung ist der „Normalzustand" erreicht.

2. *Einfluß der Impfmenge auf das Versuchsergebnis.*

Im Zuge der Vorversuche mußte auch der Frage Beachtung geschenkt werden, auf welche Weise die Menge des zur Beimpfung verwendeten Zellgemisches auf das endgültige Ergebnis — den Ernteertrag — Einfluß nimmt.

Zur Untersuchung dieser Frage wurde die Nährlösung N 25a mit Zellen aus einer 3 Tage alten Kultur, die 300 Zellen im cmm aufwies, beimpft, und zwar mit folgenden Mengen: je drei Röhrchen mit einer Zelle, eine Öse voll, ein Tropfen, 0,1 ccm und 1 ccm. Die Versuche wurden in je 10 ccm Lösung durchgeführt, und tägliche Bestimmungen der Individuenzahl im cmm vorgenommen.

Die in Tabelle II mitgeteilten Versuche hatten das folgende Ergebnis: Die verschieden starken Beimpfungen äußerten sich vor allem in einem mehr oder minder raschen Ansteigen der Zahl der Zellen in der Volumeneinheit, hatten aber keinen wesentlichen Einfluß auf das

Tabelle II. Einfluß der Impfmenge auf die Zunahme der Zahl der Zellen im cmm bei *Chilomonas paramaecium.*

Versuchstage	Beimpft mit				
	1 Zelle	1 Öse	1 Tropfen	0,1 ccm	1,0 ccm
1	—	20	70	301	611
2	—	71	239	1506	1765
3	—	143	732	1736	1910
4	10	248	1251	1855	1968
5	10	403	1546	1916	1981
6	20	672	1723	1943	1995
7	86	1078	1832	1958	1993
8	211	1506	1846	1963	2000
9	363	1703	1879	1965	2010
10	736	1846	1883	1961	2005
11	1251	1919	1880	1959	2016
12	1649	1928	1885	1955	2021
13	1773	1931	1878	1958	2009
14	1786	1930	1880	1961	2016
15	1775	1932	1881	1963	2010

endgültige Ergebnis. Die mit einer Zelle durchgeführten Beimpfungen brachten eine nur um ein geringes kleinere Zelldichte zustande, als die mit 1 ccm beimpften Versuche. Gleichzeitig mit obigen Versuchen wurde ähnliche, jedoch in je drei Kolben mit 250 ccm Lösung angesetzt. Die nach 15 Tagen durchgeführten Trockengewichtsbestimmungen zeigten auch hier (Tabelle III), daß die Menge der zur Beimpfung verwendeten Zellenaufschwemmung ohne weitere Bedeutung für die Trockensubstanzbildung ist.

Tabelle III. Einfluß der Impfmenge auf die Trockensubstanzbildung von *Chilomonas paramaecium.*

Impfmenge	Trockengewicht in mg			
	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel
1 Zelle	94,6	95,5	95,4	95,2
1 Öse	98,2	98,5	97,7	98,1
1 Tropfen	99,8	101,2	100,6	100,5
0,1 ccm	98,4	99,2	98,8	98,8
1.0 ccm	99.8	102.4	97.6	99.9

3. *Einfluß des Volumens der Nährlösung auf das Versuchsergebnis.*

Gelegentlich in anderem Zusammenhang (*Ondratschek* 1939) durchgeführte Versuche mit verschiedenen Flagellaten hatten gezeigt, daß der Vermehrungsgrad in irgendwelchem Zusammenhang mit dem zur Verfügung stehenden Flüssigkeitsvolumen steht. Daß eine größere Nährlösungsmenge einen größeren Ernteertrag hervorzubringen imstande ist, wäre infolge der ebenfalls in erhöhtem Maße zur Verfügung stehenden

Nährstoffmengen nicht weiter bemerkenswert, doch zeigten verschiedene gelegentliche Beobachtungen, daß diese Zusammenhänge nicht so einfach sein konnten, sondern daß mindestens der zur Verfügung stehende Raum eine gewisse Bedeutung beizumessen ist, ebenso der Schichthöhe der Nährlösung.

Um diese Fragen zu klären, wurden Versuche mit Nährlösungsmengen von 50, 100, 250 und 500 ccm in je sechs Kolben angesetzt, wobei gleichzeitig der Durchlüftungsfaktor derart berücksichtigt wurde, daß je drei Kolben der einzelnen Nährlösungsmengen so gefüllt wurden, daß die Flüssigkeit bis zum Halse reichte (also z. B. 100 ccm Lösung in einen 100 ccm fassenden *Erlenmeyer*-Kolben), während je drei weitere Kolben so gefüllt wurden, daß die Lösung in einer etwa 2 bis 3 cm hohen Schicht den Boden bedeckte (z. B. 100 ccm Lösung in einem 250 ccm fassenden Kolben). Erstere Anordnung erschwert den Gasaustausch zwischen Atmosphäre und Lösung einerseits durch die kleine Grenzfläche, andererseits durch die verhältnismäßig große Schichthöhe, letztere ermöglicht hingegen ungehinderten Gaswechsel infolge der geringen Schichthöhe und der großen Oberfläche der Lösung. Täglich wurde etwas Zellgemisch steril entnommen und durchgezählt. Die ganze Versuchsreihe wurde dreimal durchgeführt.

Das Ergebnis ist in Tabelle IV zusammengestellt.

Tabelle IV. Einfluß des zur Verfügung stehenden Raumes auf die Zunahme der Zahl der Zellen im cmm bei *Chilomonas paramaecium*.

Versuchstage	Kolben voll gefüllt				Kolben mit Lösung in flacher Schicht			
	Zur Verfügung stehende Nährlösungsmenge in ccm							
	50	100	250	500	50	100	250	500
1	14	—	—	—	—	—	—	—
2	54	22	16	—	36	20	—	—
3	259	169	114	10	131	60	20	10
4	974	472	462	90	289	190	72	40
5	1336	1116	1226	358	462	312	113	83
6	1876	1520	1619	946	753	537	296	107
7	1882	1890	1822	1580	840	692	576	197
8	1880	1920	2036	1792	843	780	810	440
9	1885	1922	2050	2080	846	840	872	629
10	1894	1919	2120	2200	848	851	880	682
11	1905	1920	2206	2240	846	856	840	720
12	1902	1927	2226	2300	851	853	852	705
13	1909	1922	2218	2308	849	864	854	712
14	1915	1925	2226	2292	852	862	856	723
15	1912	1930	2225	2303	850	858	856	718

Als erstes zeigte sich, daß die gute Durchlüftungsmöglichkeit bei den in flacher Schicht durchgeführten Versuchen die Vermehrungsintensität ungünstig beeinflußt. Die Zahl der Zellen im cmm nimmt bedeutend langsamer zu als bei den Versuchen in vollgefüllten Kolben und erreicht in keinem Falle auch nur annähernd die Höhe der bei dieser Versuchs-

anstellung aufgetretenen Individuendichte. Wird jedoch der Gasaustausch durch die beschriebene Anordnung erschwert, so vermehrt sich *Chilomonas* bedeutend üppiger. In diesem Falle wird die Zellenzahl im cmm etwas vom Volumen der Nährlösung beeinflußt. Bei Verwendung von 50 ccm erhält man im Durchschnitt rund 1900 Individuen im cmm, bei 500 ccm jedoch rund 2300. Zu irgendwelchen Schlüssen kann jedoch dieser kleine Unterschied noch keine Veranlassung geben. Nach Beendigung der Versuchsreihe (nach 20 Tagen) wurde in allen Fällen auch das Trockengewicht des Ernteertrages bestimmt (Tabelle V).

Tabelle V. Einfluß der zur Verfügung stehenden Nährlösungsmenge auf den Ernteertrag.

Nährlösungsmenge in ccm	Kolbenfüllung	Trockengewicht in mg				Faktor
		1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	
50	flache Schicht	14,2	13,6	15,1	14,3	1,94
	voll	26,8	28,2	28,0	27,7	
100	flache Schicht	37,5	36,5	36,9	37,0	1,97
	voll	72,9	74,2	71,6	72,9	
250	flache Schicht	66,5	65,8	67,0	66,1	2,28
	voll	150,6	152,8	149,2	150,9	
500	flache Schicht	120,6	129,2	126,8	125,5	2,61
	voll	322,2	320,8	319,2	320,7	

Diese Bestimmungen bestätigen den früheren Befund, daß *Chilomonas* besser unter solchen Bedingungen gedeiht, die einen regen Gasaustausch erschweren. Durchschnittlich liefern die mit flacher Lösungsschicht durchgeführten Versuche nur den halben Ernteertrag als die Hochschichtkulturen. Kennzeichnend ist ferner, daß der Vermehrungsfaktor mit zunehmender Flüssigkeitsmenge etwas ansteigt. Während bei 50 ccm Lösung die Hochschichtversuche nur den 1,94fachen Ernteertrag geben, verglichen mit den Versuchen in flacher Schicht, steigt dieser Faktor bei Verwendung von 500 ccm Lösung auf 2,61.

Eine besondere Versuchsreihe sollte weitere Klärung darüber schaffen, inwieweit die Ernteerträge, abgesehen von der zur Verfügung stehenden Nährstoffmenge, vom Volumen der Nährlösung beeinflußt werden.

Die Versuche wurden derart angestellt, daß Kolben von 50, 100, 200, 250 und 500 ccm Rauminhalt einmal mit der normal konzentrierten Nährlösung N 25a, ein anderes Mal mit der gleichen Nährlösung in doppelter Konzentration beschickt wurden. Sämtliche Versuche wurden in je drei Kolben durchgeführt, die bis zum Halse mit der Nährlösung gefüllt waren. Nach 15tägiger Versuchsdauer wurden Trockengewichtsbestimmungen durchgeführt.

Tabelle VI. Einfluß des Volumens und der Konzentration einer Nährlösung auf den Ernteertrag.

Nährlösungsmenge in ccm	Nährlösungskonzentration	Trockengewicht in mg				Faktoren		
		1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	*T*	Vol.	Konz.
50	normal	29,2	28,6	30,2	29,3	—	—	—
50	doppelt	38,7	40,1	36,9	38,6	1,32	1	2
100	normal	68,4	66,5	69,7	68,2	2,33	2	2
100	normal	68,4	66,5	69,7	68,2	—	—	—
100	doppelt	82,9	84,1	84,0	83,7	1,23	1	2
200	normal	124,6	126,2	122,8	124,5	1,82	2	2
250	normal	151,2	148,4	152,6	150,7	—	—	—
250	doppelt	201,2	198,6	204,3	201,4	1,34	1	2
500	normal	321,2	316,8	319,0	319,0	2,12	2	2

Die Ergebnisse finden sich in Tabelle VI. Beim Vergleich der in den einzelnen Versuchen erzielten Erntemengen zeigte sich folgendes: Während die doppelte Nährsalzmenge, hergestellt durch Verdoppelung des Volumens der Nährlösung, auch ein nahezu doppelt so großes Ernteergebnis liefert, ermöglicht die Verdoppelung der Nährsalzmenge bei gleichbleibendem Volumen der Nährlösung nur eine rund 1,3fache Ertragssteigerung. Damit ist gezeigt, daß der Ernteertrag, ausgedrückt durch das hervorgebrachte Gewicht an Trockensubstanz, außer von der vorhandenen Nährstoffmenge wesentlich auch von dem zur Verfügung stehenden Raumausmaß der Lösung bedingt ist.

B. Hauptversuche.

1. Feststellung des Aneurineinflusses auf die Trockensubstanzproduktion von Chilomonas paramaecium.

Zur Feststellung, ob Aneurin überhaupt einen ertragsteigernden Einfluß auf *Chilomonas* ausübt, wurden die in der folgenden Tabelle VII

Tabelle VII. Zusammenstellung der verwendeten Nährlösungen.

	Konzentrationsangaben in %						
	A	B	C	D	E	F	G
Pepton-*Vaillant*	0,1	—	—	—	—	—	—
Glykokoll	—	0,1	—	—	—	—	—
Asparagin	—	—	0,1	—	—	—	—
NH_4NO_3	—	—	—	0,1	—	—	—
KNO_3	—	—	—	—	0,1	—	—
NH_4Cl	—	—	—	—	—	0,1	—
NH_4-Acetat	—	—	—	—	—	—	0,2
Na-Acetat	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	—
$MgSO_4$	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
K_2HPO_4	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
$CaCl_2$	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
$FeCl_3$	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
p_H	6.7	7.3	7.1	6.9	6.8	6,9	7,1

zusammengestellten Nährlösungen mit einer Aufschwemmung von *Chilomonas* beimpft und nach 9 Tagen das Trockengewicht bestimmt.

Die Versuche wurden in je sechs Kolben mit je 250 ccm Nährlösung durchgeführt, von denen je drei Kolben 1 γ Aneurin auf 100 ccm Lösung zugesetzt erhielten, während die je drei restlichen Kolben ohne Wirkstoffzusatz blieben.

Die Trockengewichtsbestimmungen brachten das folgende Ergebnis:

a) Nährlösung A (Pepton Vaillant als N-Quelle).

Die Ernteerträge waren in den vitaminhaltigen wie vitaminfreien Versuchen nahezu gleich groß (Tabelle VIII), was nicht weiter wundernehmen darf, da bekannt ist (*Ondratschek* 1940), daß Pepton Vaillant Wirkstoffe enthält, die auf verschiedene Mikroorganismen ertragssteigernd wirken.

Tabelle VIII. Pepton Vaillant als Stickstoffquelle.

	Trockengewicht in mg				Faktor
	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	
Mit Aneurin	102,0	106,2	107,1	105,1	1,04
Ohne Aneurin	100.6	103.5	99.6	101.2	

Ein Vergleichsversuch wurde derart angesetzt, daß eine 10 %ige Stammlösung von Pepton Vaillant mit Carboraffin ausgeschüttelt wurde, wobei nach früheren Feststellungen der Wirkstoffgehalt fast quantitativ entfernt wird. Mittels dieser so zubereiteten Stammlösung wurden dann die eigentlichen Versuchslösungen angesetzt. In Tabelle IX sind die bei diesen Versuchen erzielten Erntemengen aufgezeigt. Es stellte sich somit heraus, daß der Aneurinzusatz zu einer fast wirkstoffreien Pepton-Nährlösung den an und für sich geringen Ertrag um das 52,5fache zu erhöhen imstande ist.

Tabelle IX. Mit Carboraffin ausgeschütteltes Pepton Vaillant als Stickstoffquelle.

	Trockengewicht in mg				Faktor
	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	
Mit Aneurin	107,2	101,9	106,2	105,1	52,5
Ohne Aneurin	2.3	1.9	1.8	2.0	

b) Nährlösung B (Glykokoll als N-Quelle).

Tabelle X. Glykokoll als Stickstoffquelle.

	Trockengewicht in mg				Faktor
	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	
Mit Aneurin	95,4	86,6	93,5	91,8	20,4
Ohne Aneurin	4,1	5,6	3,8	4,5	

Die Trockengewichtsbestimmungen (Tabelle X) ergaben auch hier wiederum einen ertragsteigernden Einfluß des Aneurins, doch blieb der Ertragsfaktor mit 20,4 ziemlich hinter dem mit ausgeschütteltem Pepton (50,5) zurück, wobei in den vitaminfreien Kontrollversuchen eine etwas größere Erntemenge als oben festgestellt wurde. Da das verwendete Glykokoll zufällig kein pro analysi-Präparat war, lag die Vermutung nahe, daß das vorliegende Glykokollpräparat wirkstoffhaltig sein könnte. Das wurde derart geprüft, daß verschiedene Glykokollpräparate in der gleichen Weise wie oben zur Untersuchung herangezogen wurden. Alle näheren Einzelheiten finden sich in Tabelle XI zusammengestellt.

Tabelle XI. Glykokollpräparate verschiedenen Reinheitsgrades als Stickstoffquellen.

Reinheitsgrad	Aneurin	Trockengewicht in mg				Faktor
		1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	
Technisch rein ...	mit	108,5	100,2	109,6	106,1	5,8
	ohne	17,5	18,6	18,9	18,3	
Chemisch rein	mit	98,5	99,6	100,9	99,7	23,2
	ohne	4,4	3,9	4,7	4,3	
Purissimum *Merck*	mit	96,9	97,5	96,4	96,9	44,1
	ohne	2,5	2,1	1,9	2,2	
Desgl., dreimal umkristallisiert	mit	99,8	106,5	109,6	105,3	81,2
	ohne	1,3	1,1	1,4	1,3	

Diese vergleichenden Versuche ergaben also tatsächlich einen verschieden großen Wirkstoffgehalt der einzelnen Glykokollpräparate je nach ihrem Reinheitsgrad. Erst eine dreimalige Umkristallisierung des „purissimum"-Präparats entfernte praktisch jeden Rest eines ertragsteigernden Stoffes.

c) Nährlösung C (Asparagin als N-Quelle).

Asparagin eignet sich ebenso gut wie Glykokoll als organische N-Quelle für *Chilomonas*. Auch hier ergaben die ersten Versuche (Tabelle XII) einen gewissen, nicht unbeträchtlichen Wirkstoffgehalt des zuerst verwendeten Präparats.

Tabelle XII. Asparagin als Stickstoffquelle.

	Trockengewicht in mg				Faktor
	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	
Mit Aneurin	140,6	148,5	141,2	143,4	7,8
Ohne Aneurin	20.2	17.6	18.1	18.6	

Ähnlich wie bei den mit Glykokoll durchgeführten Versuchen wurde auch mit Asparagin verschiedenen Reinheitsgrades eine eigene Versuchsreihe angestellt, um den Grad des Wirkstoffgehalts festzustellen. Es ergab sich auch hier wiederum (Tabelle XIII) eine, mit zunehmendem Reinheitsgrad geringer werdende Ernte in den vitaminfreien Versuchen, und umgekehrt zeigte sich die ertragsteigernde Wirkung des Aneurins um so deutlicher, je reiner das Asparaginpräparat war. Ein dreimal umkristallisiertes Asparagin purissimum *Merck* kann als praktisch wirkstoffrei betrachtet werden.

Tabelle XIII. Asparagin verschiedenen Reinheitsgrades als Stickstoffquelle.

Asparaginpräparat	Aneurin-gehalt	Trockengewicht in mg				Faktor
		1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	
Handelsware ohne nähere Bezeichnung	mit ohne	114,5 75,8	132,9 62,1	120,1 69,5	122,5 69,1	1,77
Chemisch rein	mit ohne	156,9 15,1	174,2 12,9	160,9 12,3	164,0 13,4	12,25
Purissimum *Merck* .	mit ohne	165,8 3,8	161,0 4,9	159,8 3,2	162,2 4,0	40,05
Purissimum *Merck*, dreimal umkristallisiert	mit ohne	168,0 2,0	169,5 2,5	178,6 2,9	172,0 2,2	78,2

d) Nährlösung D (NH_4NO_3 als N-Quelle).

Hiermit begannen Versuche, um festzustellen, ob *Chilomonas* auch imstande ist, mit Hilfe des Aneurins anorganischen Stickstoff auszunutzen. Da es zweckmäßig schien, bei diesen ersten Versuchen Ammonstickstoff neben Nitratstickstoff zu bieten, gelangte NH_4NO_3 als N-Quelle zur Verwendung. Es zeigte sich (Tabelle XIV), daß diese Substanz durchaus verwertbar ist, jedoch nur mit Hilfe des Wachstumsfaktors. Ohne Aneurinzusatz lieferten die Kontrollkulturen nur unbedeutende Erträge.

Tabelle XIV. NH_4NO_3 als Stickstoffquelle.

	Trockengewicht in mg				Faktor
	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	
Mit Aneurin	109,8	99,6	111,4	106,9	82,1
Ohne Aneurin	1,1	1,3	1,4	1,3	

e) Nährlösung E und F (KNO_3 und NH_4Cl als N-Quellen).

Diese Versuche sollten zeigen, in welcher Weise die beiden Bestandteile des NH_4NO_3 von *Chilomonas* verwertet werden. Es zeigte sich überraschenderweise, daß *Chilomonas* auch den Nitratstickstoff zu assimilieren imstande ist, wenngleich hier die Ernteerträge im Vergleich

zu den mit Ammonstickstoff erzielten bedeutend niedriger sind. NH_4Cl ist als N-Quelle nahezu dem NH_4NO_3 gleichwertig. Die Ergebnisse der Trockengewichtsbestimmungen sind in Tabelle XV und XVI zusammengefaßt.

Tabelle XV. KNO_3 als Stickstoffquelle.

	Trockengewicht in mg				Faktor
	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	
Mit Aneurin	38,5	36,2	33,4	36,0	72,0
Ohne Aneurin	0,4	0,6	0,5	0,5	

Tabelle XVI. NH_4Cl als Stickstoffquelle.

	Trockengewicht in mg				Faktor
	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	
Mit Aneurin	99,6	103,5	104,6	102,6	73,3
Ohne Aneurin	1,4	1,2	1,5	1,4	

f) Nährlösung G (Ammonacetat als C- und N-Quelle).

Schließlich sollte noch geprüft werden, ob die gleichzeitige Darbietung von Kohlenstoff und Stickstoff in einer Verbindung, nämlich als Ammonacetat, den Ansprüchen von *Chilomonas* genügt. Anfängliche Versuche verliefen negativ, was durchaus den Ergebnissen von *Lwoff* (1938) entsprach. Es war aber nicht einzusehen, warum eine Nährlösung mit NH_4Cl und Na-Acetat eine Vermehrung ermöglicht, während eine NH_4-acetathaltige dies nicht tun sollte. Nach längeren Versuchen wurde gefunden, daß *frisches* Ammonacetat durchaus verwertbar ist, wenn die damit zubereitete Nährlösung durch Zugabe eines m/30-Phosphatpuffers gegen p_H-Verschiebungen gesichert und wenn nicht im Autoklaven unter Druck, sondern nur 1 Stunde bei 100° C im Dampftopf sterilisiert wird. Ein älteres Präparat von Ammonacetat ist durchaus ungeeignet, vermutlich infolge einer bereits eingetretenen teilweisen Zersetzung. Ebenso macht ein Erhitzen der Ammonacetatlösung im Autoklaven auf 120° C diese unbrauchbar. Eine ungepufferte derartige Lösung verändert auch ohne Beimpfung beim Aufbewahren im Thermostaten bei 25° C dauernd ihre Reaktion. Damit ist die Ursache für viele mißlungene Versuche mit Ammonacetat geklärt. Das Ergebnis unserer Versuche zeigt Tabelle XVII.

Tabelle XVII. Ammonacetat als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle.

	Trockengewicht in mg				Faktor
	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	
Mit Aneurin	106,7	102,2	99,2	102,7	79,0
Ohne Aneurin	1,2	1,0	1,6	1,3	

Wie bereits einleitend erwähnt, hatte *Lwoff* (1937) festgestellt, daß *Chilomonas* in einer Asparagin enthaltenden Nährlösung mittels Aneurin in seiner Vermehrung wesentlich gefördert wird. Da *Lwoff* eine etwas anders zusammengesetzte Nährlösung verwendet hatte, als es hier der Fall war, schien es notwendig, beide Lösungen bezüglich ihrer Wirkung zu vergleichen.

Dazu wurden folgende Lösungen in je fünf Röhrchen mit *Chilomonas* beimpft und durch fünf Passagen zu je 8 Tagen gezüchtet.

Nährlösung nach Lwoff: Asparagin 0,2 %, Na-Acetat 0,2 %, $MgSO_4$ 0,01 %, KH_2PO_4 0,02 %, KCl 0,01 %, $FeCl_3$ „Spur" (hier wurde 0,0001 % genommen). $p_H = 6{,}6$.

Unsere Nährlösung: Asparagin 0,1 %, Na-Acetat 0,2 %, $MgSO_4$ 0,01 %, K_2HPO_4 0,01 %, $CaCl_2$ 0,001 % $FeCl_3$ 0,0001 %. $p_H = 6{,}5$.

Da *Lwoff* keine Angaben über die verwendete Aneurinkonzentration gibt, wurde in beiden Fällen je 1 γ Aneurin auf 100 ccm Nährlösung zugesetzt.

In beiden Nährlösungen wurde in allen fünf Passagen durchschnittlich eine Individuendichte von 2200 Zellen im cmm bei Aneurinzusatz, von 50 Zellen im cmm in den aneurinfreien Kontrollen erzielt. Die in gleicher Weise durchgeführten Versuche in 250 ccm Lösung (Tabelle XVIII) zeigten, daß beide Lösungen gleichwertig sind.

Tabelle XVIII. Vergleich der Ernteerträge in einer Nährlösung nach *Lwoff* und in unserer Lösung C.

Nährlösung	Aneurin	Trockengewicht in mg				Faktor
		1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	
Nach *Lwoff* . .	ohne	1,9	1,8	2,0	1,9	77,1
	mit	145,2	141,8	152,3	146,4	
Unsere C	ohne	2,4	2,3	2,9	2,5	75,8
	mit	174,2	180,9	213,7	189,6	

2. *Feststellung der am günstigsten wirkenden Konzentrationen der einzelnen Nährsalze.*

a) Optimale Natriumacetatkonzentration.

Nährlösung D wurde mit verschiedenen Na-Acetatkonzentrationen von 0,001 bis 5,0 % versehen und einmal in je 10 ccm in Röhrchen, das andere Mal in je 250 ccm in Kolben mit *Chilomonas* beimpft. Die Versuche in Röhrchen wurden durch drei Passagen zu je 6 Tagen gezüchtet.

Sie ergaben bei einer Konzentration von 0,2 bis 1,0 % eine durchschnittliche Zelldichte von 2500 Individuen im cmm, von 0,1 % nimmt diese allmählich ab, bis sie bei 0,01 % nur mehr die Höhe von 300 erreicht. Konzentrationen über 1,0 % wirken bereits schädlich, unter 0,01 % sind sie nicht mehr ausreichend. Die gleichfalls durchgeführten Trockengewichtsbestimmungen ergänzten diese Befunde (Tabelle XIX).

Tabelle XIX. Abhängigkeit des Trockengewichts von *Chilomonas Paramaecium* von der Acetatkonzentration.

Natrium-acetat in %	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel-wert	Natrium-acetat in %	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel-wert
5,0	—	—	—	—	0,025	34,6	35,8	35,6	35,1
2,5	—	—	—	—	0,010	16,2	18,0	15,6	16,6
1,0	120,8	122,0	120,4	121,1	0,0075	5,0	4,6	5,3	5,0
0,75	121,4	119,8	120,8	120,7	0,0050	1,0	0,6	0,8	0,8
0,50	118,2	118,8	120,0	119,0	0,0025	—	—	—	—
0,25	120,2	117,8	118,2	118,7	0,0010	—	—	—	—
0,10	108,0	110,2	109,2	109,1	ohne Acetat	—	—	—	—
0,075	90,2	88,6	89,4	89,4					
0,050	61,3	59,2	59,8	60,1					

Aus dieser Tabelle ist zu entnehmen, daß erst eine Konzentration von 0,005 % Vermehrung zuläßt, die allerdings noch verschwindend gering ist. Mit zunehmender Konzentration steigen die Ernteerträge, bis sie schließlich bei 0,25 % einen Punkt erreichen, über den hinaus auch weitere Konzentrationssteigerungen keine wesentlich vermehrten Ernteerträge mehr liefern. Die hier üblicherweise verwendete Konzentration (0,2 % Na-Acetat) liegt also durchaus im optimalen Gebiet.

b) Optimale N-Konzentration.

In ähnlicher Weise wie bei den vorangegangenen Versuchen wurde die Nährlösung D dermaßen abgeändert,

daß Ammonnitrat in Abstufungen von 10^{-1} bis 10^{-7} % geboten wurde, wobei in einer Reihe von Parallelreihen verschiedene Aneurinbeigaben von 1 γ bis 0,0001 γ je 100 ccm Nährlösung zugesetzt wurden. Die Versuche wurden sowohl in Röhrchen als auch in größerer Flüssigkeitsmenge in Kolben durchgeführt.

Die Ergebnisse beider Versuchsarten entsprachen einander, so daß im folgenden nur die in Tabelle XX zusammengestellten Trockengewichtsbestimmungen zur näheren Besprechung gelangen. Sie zeigten einmal, daß eine Konzentration von 0,01 % Ammonnitrat als optimal zu betrachten ist. Höhere Konzentrationen liefern zwar annähernd gleiche Ernteerträge, doch ist der Zustand des Zellgemisches (bei Verwendung von über 0,1 %) weitgehend verändert, zahlreiche Zellen liegen abgestorben am Boden des Versuchsgefäßes, verschiedene morphologische Formveränderungen treten auf. Niedrigere Konzentrationen als 0,01 % liefern entsprechend geringere Ernten. Andererseits zeigen diese Versuche deutlich die Abhängigkeit der Trockensubstanzproduktion von der Aneurinkonzentration. Nur die Anwendung der optimalen Aneurindosis von 1 γ auf 100 ccm Nährlösung ermöglicht bei gleichzeitiger optimaler Konzentration der übrigen Nährstoffe das Erreichen einer maximalen Ernte.

Tabelle XX. Beeinflussung des Trockengewichts der Ernteerträge von *Chilomonas paramaecium* bei Züchtung mit verschiedenen NH_4NO_3-Konzentrationen bei verschiedenem Aneuringehalt der Nährlösung.

NH_4NO_3 in %	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittelwert
	Aneurin optimal = 1 γ/100 ccm = 10^{-6} %.			
10^{-1}	128,6	126,4	129,2	128,1
10^{-2}	139,2	140,6	138,4	139,4
10^{-3}	94,2	93,1	94,6	94,0
10^{-4}	60,8	59,2	62,0	60,7
10^{-5}	18,2	16,9	17,5	17,5
10^{-6}	3,2	2,8	2,6	2,9
10^{-7}	—	—	—	—
ohne	—	—	—	—
	Aneurin suboptimal = 0,1 γ/100 ccm = 10^{-7} %.			
10^{-1}	105,4	106,7	104,8	105,6
10^{-2}	112,6	114,0	111,8	112,8
10^{-3}	74,5	75,5	76,2	75,4
10^{-4}	45,2	43,6	46,2	45,0
10^{-5}	16,8	16,9	15,2	16,3
10^{-6}	1,3	1,5	1,8	1,5
10^{-7}	—	—	—	—
ohne	—	—	—	—
	Aneurin = 0,01 γ/100 ccm = 10^{-8} %.			
10^{-1}	53,2	54,1	54,8	54,0
10^{-2}	54,1	55,6	55,0	54,9
10^{-3}	35,6	34,0	35,8	35,1
10^{-4}	25,0	26,2	24,6	25,3
10^{-5}	8,9	10,2	9,8	9,6
10^{-6}	—	—	—	—
10^{-7}	—	—	—	—
ohne	—	—	—	—
	Aneurin = 0,001 γ/100 ccm = 10^{-9} %.			
10^{-1}	20,2	18,6	18,9	19,2
10^{-2}	21,4	22,0	21,8	21,7
10^{-3}	9,6	10,2	10,5	10,1
10^{-4}	1,2	2,2	2,3	1,9
10^{-5}	—	—	—	—
10^{-6}	—	—	—	—
10^{-7}	—	—	—	—
ohne	—	—	—	—
	Aneurin = 0,0001 γ/100 ccm = 10^{-10} %.			
10^{-1}	2,5	2,9	2,2	2,5
10^{-2}	1,2	0,8	0,7	0,9
10^{-3}	—	—	—	—
10^{-4}	—	—	—	—
10^{-6}	—	—	—	—
10^{-5}	—	—	—	—
10^{-7}	—	—	—	—
ohne	—	—	—	—

c) Günstigste Konzentration des Mineralsalzgemisches.

Nährlösung D wurde derart verändert, daß die Salze K_2HPO_4, $MgSO_4$, $CaCl_2$ und $FeCl_3$, ausgehend von der normalen Konzentration, in verschiedenen Verdünnungsstufen von 1 : 10 bis 1 : 10000 angewendet wurden.

Die Zellzahlbestimmungen ergaben wiederum ein gleiches Ergebnis wie die durchgeführten Trockengewichtsbestimmungen (Tabelle XXI).

Tabelle XXI. Einfluß der Konzentration der gesamten Mineralsalze auf die Ernte bei *Chilomonas paramaecium.*

Konzentration der Mineralsalze	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittelwert
Normal (siehe Tabelle VII)..	135,6	132,2	134,8	134,2
1 : 10 verdünnt	142,0	136,2	128,9	135,7
1 : 100 „	62,5	64,3	65,2	64,0
1 : 1000 „	23,0	19,6	22,2	21,6
1 : 10 000 „	3,6	2,2	2,9	2,9
Ohne Mineralsalze	–	—	—	—

Es geht daraus hervor, daß die normalerweise angewendete Konzentration ebenso günstig ist wie auch eine auf $^1/_{10}$ verdünnte. Gewisse Bedenken ließen es jedoch ratsam erscheinen, jeden Bestandteil des Salzgemisches für sich nochmals eingehend auf seine wirksamste Konzentration hin zu prüfen.

d) Optimale K_2HPO_4-Konzentration.

K_2HPO_4 wurde in verschiedenen Verdünnungsstufen von 0,05 % bis 0,000001 % zu der sonst vollständigen Nährlösung D zugesetzt und in einigen Kolben je 250 ccm davon mit *Chilomonas* beimpft.

Die Trockengewichtsbestimmungen ergaben (Tabelle XXII) ein Optimum bei 0,01 %.

Tabelle XXII. Optimale K_2HPO_4-Konzentration für *Chilomonas paramaecium.*

K_2HPO_4 in %	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittelwert
0,05	96,5	94,6	95,8	95,6
0,01	120,6	118,4	121,3	126,8
0,001	100,8	98,8	102,0	100,5
0,000 1	49,0	48,2	46,8	48,0
0,000 01	3,6	4,5	4,2	4,1
0,000 001	0,2	0,1	0,1	0,1
ohne	—	—	—	—

e) Optimale $MgSO_4$-Konzentration.

Die in gleicher Weise durchgeführten Bestimmungen (Tabelle XXIII) zeigten eine Konzentration von 0,01 % als am günstigsten wirksam.

Tabelle XXIII. Optimale $MgSO_4$-Konzentration für *Chilomonas paramaecium*.

$MgSO_4$ in %	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittelwert
0,05	106,8	108,7	107,5	107,7
0,01	120,6	118,2	121,3	120,0
0,001	96,2	94,6	94,8	95,2
0,000 1	24,5	23,6	24,8	24,3
0,000 01	1,5	1,8	1,6	1,6
ohne	—	—	—	–

f) Einfluß der $CaCl_2$-Konzentration auf den Ernteertrag.

Die Trockengewichtsbestimmungen dieser Versuche ergaben (Tabelle XXIV), daß ein besonderer Calciumzusatz zur Nährlösung nicht notwendig ist, womit aber nicht gesagt sein soll, daß *Chilomonas* ohne Calcium zu gedeihen vermag, vielmehr scheint die Ca-Abgabe des Glases den Bedarf decken zu können. Die Versuche ohne Beigabe von $CaCl_2$ zur Nährlösung brachten nur um ein geringes niedrigere Ernten als die $CaCl_2$-haltigen Kulturen.

Tabelle XXIV. Einfluß der Ca-Konzentration auf den Ernteertrag.

$CaCl_2$ in %	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittelwert
0,01	108,9	110,2	106,6	108,6
0,001	106,9	108,6	109,2	108,2
0,0001	104,2	105,6	103,9	104,6
ohne	98,6	96,9	99,6	98,4

g) Optimale $FeCl_3$-Konzentration.

Zur üblichen Nährlösung D wurde $FeCl_3$ in Konzentrationen von 10^{-3} bis 10^{-8}% zugesetzt. Die Trockengewichtsbestimmungen (Tabelle XXV) ergaben, daß eine Konzentration von 0,0001 % am günstigsten ist. Die bekannte Fe-Abgabe des Jenaerglases an die Nährlösung genügt auffallenderweise den Ansprüchen von *Chilomonas* nicht. In den eisenfreien Kontrollen vermehrte sich *Chilomonas* zwar auch, doch blieben die Erträge weit hinter denen mit $FeCl_3$-Zusatz zurück.

Tabelle XXV. Einfluß der Fe-Konzentration auf den Ernteertrag.

$FeCl_3$ in %	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittelwert
0,001	105,0	109,2	104,3	106,5
0,000 1	115,0	119,2	112,2	115,5
0,000 01	102,0	99,6	103,2	101,6
0,000 001	96.2	94,2	95,8	95,4
0,000 000 1	41,2	45,3	43,3	43,3
0,000 000 01	22.5	23,7	21,9	22,7
ohne	2,2	2,5	2,0	2,2

Aus den vorliegenden Einzelbestimmungen ergab sich somit eine wie folgt zusammengesetzte Nährlösung als für *Chilomonas* am günstigsten:

Na-Acetat 0,2 %, NH_4NO_3 0,01 %, K_2HPO_4 0,01 %, $MgSO_4$ 0,01 % und $FeCl_3$ 0,0001 %.

3. *Bestimmung der für Chilomonas optimalen Aneurinkonzentration.*

Anschließend an die im vorigen Abschnitt geschilderten Versuche bestand die nächste Aufgabe darin, festzustellen, welche Beziehungen zwischen der Menge des zur Verfügung stehenden Aneurins und der Größe des Ernteertrages bestehen.

Zur Untersuchung dieser Frage wurde die bereits bekannte Nährlösung D einmal in 10 ccm in Röhrchen, das andere Mal zu 250 ccm in Kolben abgefüllt, die eine Hälfte der Versuchsgefäße mit steigenden Aneurinmengen von 10^{-3} bis 10^{-20} % versetzt, während die zweite Hälfte ohne einen solchen Zusatz blieb und schließlich in alle Gefäße *Chilomonas* geimpft.

Die durch mehrere Passagen mit ständig frischer Nährlösung durchgeführten Versuche mit je 10 ccm Lösung ergaben bei einer Aneurinkonzentration von 10^{-3} % (= 1 mg auf 100) bis 10^{-6} % (= 1 γ auf 100) einen durchschnittlichen Ernteertrag von rund 2400 bis 2500 Zellen im cmm, bei 10^{-9} % Aneurin nur mehr den halben Ertrag und ähnlich fällt dieser im gleichen Sinne mit abnehmender Aneurinkonzentration. Der Einfluß des Aneurins ist in allen Fällen noch bei einer Aneurinkonzentration von 10^{-12} % feststellbar, unter dieser Konzentration findet keine sichtbare Vermehrung mehr statt. Die gleichfalls durchgeführten Trockengewichtsbestimmungen sind in Tabelle XXVI zusammengestellt, wobei zur Vereinfachung alle Konzentrationen unter 10^{-10} wegen ihrer Bedeutungslosigkeit weggelassen wurden.

Tabelle XXVI. Ernteerträge bei verschiedener Aneurinkonzentration.

Aneurin in %	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	Faktor
10^{-3}	120,2	116,6	115,6	117,5	90,4
10^{-4}	125,4	126,2	123,8	125,1	96,2
10^{-5}	126,2	124,6	128,9	126,6	97,4
10^{-6}	130,1	129,2	129,8	129,7	99,7
10^{-7}	105,2	103,6	104,2	104,3	80,2
10^{-8}	70,1	68,2	70,9	69,7	53,6
10^{-9}	20,5	20,1	18,6	19,7	15,2
10^{-10}	2,0	2,2	2,0	2,1	1,55
ohne Aneurin	1,3	1,5	1,0	1,3	—

Die Trockengewichtsbestimmungen an den mit verschiedenen Aneurinmengen erzielten Ernteerträgen zeigten auf ähnliche Weise wie die vorher besprochenen Bestimmungen der Zahl der Zellen im cmm, daß eine Konzentration von 10^{-10} eine eben noch merkbare Ertrags-

steigerung bewirkt, welche dann mit steigender Aneurinkonzentration immer deutlicher wird, bis sie schließlich bei einer Konzentration von 10^{-6} ihren Höhepunkt erreicht. Bei dieser Konzentration bedingt der Zusatz des Aneurins einen nahezu 100fachen Ernteertrag im Vergleich mit der vitaminfreien Kontrolle. Höhere Konzentrationen wirken in gleichem Maße, jedoch nehmen mit steigender Konzentration die Ernteerträge gewichtsmäßig etwas ab.

Das Optimum der Aneurinwirkung liegt somit für *Chilomonas paramaecium* bei einer Konzentration von 10^{-6} %, mit anderen Worten, bei einer Zugabe von 1 γ Aneurin auf 100 ccm der Lösung.

4. Einfluß der Sterilisation auf die Verwertbarkeit des Eisens.

Lwoff und *Dusi* (1938) haben festgestellt, daß durch gemeinsame Sterilisation des Ferrichlorids oder -citrats mit der übrigen Nährlösung das Eisen unwirksam wird. In einer derart sterilisierten, vollständigen Nährlösung ist nach *Lwoff* niemals eine Vermehrung zu erzielen, wird jedoch $FeCl_3$ nach der Sterilisation der übrigen Nährlösung zugesetzt, so bleibt es verwendbar, *Chilomonas* (und andere *Flagellaten*) gedeihen in einer derart bereiteten Nährlösung gut. Nicht gesagt wird in der genannten Mitteilung in der etwas ungenauen Angabe der Versuchsbedingungen, auf welche Weise das Eisenchlorid bzw. -citrat für sich sterilisiert wurde.

Zahlreiche Beobachtungen in unserem Institut widersprechen diesen Befunden. Wir sterilisieren ohne Ausmaße unsere sämtlichen Nährlösungen in vollständiger Zusammensetzung und haben niemals gefunden, daß diese dadurch für irgendeinen der zahlreichen, von uns in Kultur gehaltenen Algenstämme unbrauchbar werden würde. Dies zwang zu einer besonderen Untersuchung über die oben genannte Frage, ob $FeCl_3$ beim Sterilisieren mit der übrigen Nährlösung unwirksam wird. Notwendig waren diese Versuche auch aus dem Grunde, weil *Lwoff* verschiedene Unklarheiten in den *Pringsheim*schen Arbeiten (1937) durch die obige Behauptung geklärt haben will.

Zur Verwendung gelangte die von *Lwoff* (1938) angegebene Nährlösung: NH_4Cl 0,1 %, Na-Acetat 0,1 %, $MgSO_4$ 0,01 %, KH_2PO_4 0,02 %, KCl 0,01 %, $CaCl_2$ 0,001 % und $FeCl_3$ 0,0001 %. Ein Teil wurde gemeinsam sterilisiert, bei einem anderen Teil erfolgte die Entkeimung des $CaCl_2$ und $FeCl_3$ getrennt von der übrigen Nährlösung, mit welcher die Ca- und Fe-haltige Lösung erst nach der Sterilisation vereint wurde. Jede der beiden Abänderungen erhielt zur Hälfte 1 γ Aneurin auf 100 ccm Lösung, zur Hälfte blieben die Lösungen ohne Vitaminzusatz. Die Versuche wurden in je fünf Röhrchen angesetzt und durch drei Passagen überimpft.

Die aneurinfreie Nährlösung ermöglichte in keinem Falle Vermehrung, in den mit Aneurinzusatz versehenen Röhrchen erfolgte hingegen in allen Fällen üppige Vermehrung, gleichgültig, ob das $CaCl_2$ und $FeCl_3$ mit der übrigen Nährlösung oder getrennt davon sterilisiert

wurde. Die Bestimmung der Zahl der Zellen im cmm zeigte in allen Passagen bei beiden Versuchsabänderungen das gleiche Ergebnis: die Individuenzahl im cmm bewegte sich ständig zwischen 2200 bis 2400. Um dieses Ergebnis noch weiter zu festigen, wurde die gesamte Versuchsreihe noch dreimal wiederholt. Mit geringfügigen Abweichungen in der Anzahl der Zellen im cmm blieben die aufgezeigten Verhältnisse unverändert. Der Einwand von *Lwoff* und *Dusi*, daß $FeCl_3$ durch gemeinsames Sterilisieren mit der übrigen Nährlösung unwirksam bzw. nicht verwertbar wird, ist somit nicht gerechtfertigt.

Lwoff (1938) hat ferner vermutet, daß das von *Pringsheim* (1937) als „Wuchsstoff" verwendete Glucosekaramel dahingehend wirkt, daß es das Eisen in Lösung bzw. in einer verwertbaren Form erhalte und vor dem Ausfällen schütze. Eigene Versuche mit verschiedenen Karamelzusätzen zu Nährlösungen, die z. T. mit Ferrichlorid zusammen sterilisiert worden waren, z. T. das $FeCl_3$ erst nach der Sterilisation zugesetzt erhielten, ergaben, daß Glucosekaramel ohne jeden Einfluß auf die Verwertbarkeit des Eisens ist. Es hat sich hingegen auch hier, wie bereits *Pringsheim* (1937) festgestellt hatte, eine ertragsteigernde Wirkung des Karamels ergeben, welche jedoch weit hinter der mit Aneurin erzielten Wirkung zurückbleibt. Die mit Karamel erzeugten Ernteerträge stellen im Höchstfall $^1/_{10}$ der mit Aneurinzusatz erzielten Erträge dar. Eine eingehende Darstellung der Ergebnisse in Tabellenform ist wegen der Eindeutigkeit der Ergebnisse und aus Gründen der Raumersparnis nicht nötig.

5. Vergleich der Aneurinwirkung mit der eines Thiazol-Pyrimidingemisches.

Lwoff hat 1938 festgestellt, daß *Chilomonas paramaecium* auch mit Thiazol allein zu gedeihen vermag, also imstande sein muß, Pyrimidin selbst zu bilden. Da diese Mitteilung verschiedene Einzelheiten vermissen ließ, war es notwendig, diese Feststellung eingehender zu überprüfen.

Dazu wurde eine Aneurinlösung, die 1 mg Aneurin in 100 ccm doppelt destilliertem Wasser enthielt, durch dreimaliges, länger andauerndes Erhitzen auf 130° C weitgehend in Thiazol und Pyrimidin zerlegt und mit Chloroform behandelt. Die Chloroformextraktion enthielt dann das gesamte Thiazol, der wässerige Anteil, das Pyrimidin und gegebenenfalls etwaige Aneurinreste.

Die vollständige Nährlösung D erhielt nun folgende Zusätze:

a) Aneurin 1 γ/100 ccm;
b) ein durch längeres Erhitzen (s. oben) erzieltes Thiazol-Pyrimidingemisch, zusammen etwa 1 γ/100 ccm;
c) Thiazol = 0,1 ccm der Chloroformextraktion, entspricht ungefähr 1 γ Thiazol auf 100 ccm;
d) Pyrimidin = 0,1 % der wässerigen Extraktion entsprechend ungefähr 1 γ Pyrimidin auf 100 ccm Lösung;
e) blieb ohne weiteren Zusatz.

Die Versuche wurden in je drei Kolben in 250 ccm Lösung durchgeführt.

Tabelle XXVII. Aneurin und seine Komponenten als ertragsteigernde Faktoren für *Chilomonas Paramaecium*.

Wachstumsfaktor	1. Kolben	2. Kolben	3. Kolben	Mittel	Faktor
a) Aneurin	118,6	120,2	116,4	118,4	98,7
b) Thiazol + Pyrimidin	117,9	121,2	118,3	119,1	99,3
c) Thiazol	68,5	74,2	42,3	61,7	51,4
d) Pyrimidin	10,1	8,6	9,6	9,4	7,8
e) ohne	1,0	1,4	1,1	1,2	—

Die in Tabelle XXVII zusammengestellten Ergebnisse der Trockengewichtsbestimmung zeigten, daß ein Gemisch von Thiazol und Pyrimidin, den beiden Bausteinen des Aneurinmoleküls, ebenso wirksam ist wie das Aneurin selbst, Thiazol allein hingegen nicht die gleiche ertragsteigernde Wirkung besitzt. *Lwoff* (1937) behauptet dies zwar, bleibt aber den Beweis durch quantitative Bestimmungen schuldig. Pyrimidin ist für sich nur schwach wirksam, wenn berücksichtigt wird, daß unsere Pyrimidinextraktion sicherlich etwas nicht abgebautes Aneurin enthält; somit kann angenommen werden, daß Pyrimidin für sich allein überhaupt keinen erstragsteigernden Faktor darstellt. Die Deutung der vorstehenden Versuche kann wohl nur so sein, daß *Chilomonas* sowohl Thiazol als auch Pyrimidin benötigt, daß jedoch der Verlust der Fähigkeit zur Synthese des Thiazols weitgehender ist als jener zur Pyrimidinbildung. Aneurin stellt demnach einen Wachstumsfaktor für *Chilomonas paramaecium* dar, es kann dabei durch seine beiden Bestandteile Pyrimidin und Thiazol ersetzt werden. Thiazol allein stellt wohl auch eine ertragsteigernde Substanz vor, kann aber entgegen der Anschauung *Lwoffs* nicht Anspruch darauf erheben, als Wachstumsfaktor betrachtet zu werden.

6. *Einfluß von Kohlensäure auf die Vermehrung von Chilomonas.*

Mast und *Pace* (1934) haben festgestellt, daß *Chilomonas* in einer rein anorganischen Nährlösung zu gedeihen vermag, falls eine geringe Menge Na_2SiO_3 als Katalysator zugegen ist und der Versuchsraum einen genügenden CO_2-Gehalt aufweist. Da die geschilderten Versuche zeigen, daß *Chilomonas* keinerlei organische C-Quellen zur Verfügung standen, muß angenommen werden, daß *Chilomonas* unter diesen Bedingungen seinen Kohlenstoffbedarf aus der Kohlensäure der Luft deckt. Als günstigstes Verhältnis von CO_2 : Luft wurde das Verhältnis 1 : 5 gefunden.

Im Laufe der vorliegenden Arbeit gelang es trotz mannigfaltiger Veränderungen der Versuchsbedingungen nicht, *Chilomonas* ohne Zusatz einer organischen C-Quelle zur Vermehrung zu bringen, wohl aber war eine gewisse Ertragsteigerung durch Anwendung höherer CO_2-Konzentrationen möglich.

Für unsere Versuche gelangten die folgenden Nährlösungen zur Verwendung:

1. Na-Acetat 0,2 %, NH_4NO_3 0,01 %, $MgSO_4$ 0,01 %, K_2HPO_4 0,01 % und $FeCl_3$ 0,0001 %.

2. Desgleichen ohne Na-Acetat.

3. Nach *Mast* und *Pace*: $MgSO_4$ 0,01 %, K_2HPO_4 0,02 %, NH_4Cl 0,05 %, Na_2SiO_3 0,01 %. Mit HCl neutralisiert.

Alle drei Nährlösungen erhielten zur Hälfte 1 γ Aneurin auf 100 ccm Lösung, zur Hälfte blieben sie ohne Vitaminzusatz. Sämtliche Lösungen wurden beimpft und nun je eine Serie von Röhrchen im Thermostaten bei 25° C aufbewahrt, eine zweite Serie wurde in einem CO_2-freien Raum und eine dritte Partie in einem Gefäß mit einem CO_2-Luftgemisch von 1 : 5 aufgestellt.

Vermehrung trat nur mit Nährlösung 1 ein, falls sie aneurinhaltig war, und zwar sowohl unter normalen Bedingungen, wie auch unter CO_2-freien. Durchschnittlich wurde eine Individuendichte von 2000 bis 2200 Zellen im cmm erreicht. Durch Anwendung des CO_2-Luftgemisches 1 : 5 konnte diese auf 2600 gesteigert werden. In den Na-Acetat-freien Lösungen 2 und 3 trat in keinem Falle Vermehrung ein. Demzufolge bestätigen sich zwar die Angaben von *Mast* und *Pace*, daß *Chilomonas* durch Kohlensäure in seiner Vermehrung angeregt wird, eine Kohlensäureassimilation findet aber nicht statt.

Besprechung der Versuchsergebnisse.

Die vorliegenden Untersuchungen hatten sich zur Aufgabe gestellt, die Bedeutung eines Wirkstoffs — Aneurin — für *Chilomonas paramaecium* aufzuklären, dessen Wirkung als Wachstumsfaktor für zahlreiche andere Organismen bereits festgestellt worden war.

Einleitende Versuche hatten die Bedeutung des physiologischen Zustandes für das Versuchsergebnis aufgezeigt. Auch bei den *farblosen Flagellaten* muß — wie dies für verschiedene andere Algengruppen bereits nachgewiesen ist — für jeden physiologischen Versuch ein Zellmaterial verwendet werden, das in seinen physiologischen und morphologischen Eigenschaften streng definiert ist. Die Vorversuche zeigten ferner, daß im Gegensatz zu anderen Organismen (z. B. *Hefe*) bei *Chilomonas* die Menge des zur Beimpfung eines Versuchs verwendeten Zellgemisches keine ausschlaggebende Bedeutung hat. Endlich wurde noch einem weiteren Punkte Beachtung geschenkt, nämlich der Bedeutung des Raumausmaßes der Nährlösung und der Gaswechselmöglichkeit. Es hat sich gezeigt, daß die Anwendung von Versuchsbedingungen, die eine gute Durchlüftung der Lösung gestatten, für *Chilomonas* von Nachteil sind. Wird hingegen durch eine entsprechende Versuchsanstellung dafür gesorgt, daß der Gasaustausch zwischen Lösung und Atmosphäre etwas gehemmt wird, so vermehrt sich unser Organismus bedeutend üppiger. Dieser Befund steht in Beziehung mit im Freiland beobachteten Tatsachen, daß nämlich *Chilomonas* und andere

farblose Flagellaten vor allem an Standorten auftreten, die eine geringe Sauerstofftension aufweisen. Weiters zeigten letztgenannte Versuche, daß die Vermehrung von *Chilomonas* außer von der zur Verfügung stehenden Nährstoffmenge noch von einem anderen Faktor — er sei hier als „Raumfaktor“ bezeichnet — beeinflußt wird. Die Versuche ergaben nämlich, daß die gleiche Menge von Nährstoffen in verschieden großen Lösungsvolumen angewendet, einen verschieden großen Ernteertrag hervorzubringen imstande ist, und zwar so, daß der größere Rauminhalt auch eine größere Trockensubstanzproduktion ermöglicht.

Nach der Klärung dieser, für die weiteren Versuche als Voraussetzung notwendig gewesenen Verhältnisse konnte an die eigentliche Untersuchung des Aneurineinflusses geschritten werden. Nachdem verschiedene Schwierigkeiten, wie Wirkstoffgehalt einiger organischer N-Quellen, beseitigt worden waren, zeigte sich, daß Aneurin, in geringen Dosen angewendet, die mit organischer C- und N-Quelle erzielten Ernteerträge um das 80- bis 100fache zu steigern in der Lage ist. Weitere Versuche ergaben, daß *Chilomonas* mit Hilfe dieses Wachstumsfaktors imstande ist, auch anorganischen Stickstoff auszunutzen. Selbst Nitratstickstoff ist verwertbar, wenn auch in geringerem Maße als Ammonstickstoff, welcher jede organische Stickstoffquelle vollkommen zu ersetzen vermag.

Weitere ausgedehnte Versuche beschäftigten sich mit der Feststellung der optimalen Nährsalzkonzentrationen. Sie schienen deshalb notwendig, weil die vorliegende Arbeit Grundlage für weitere Untersuchungen des Wirkstoffbedürfnisses verschiedener farbloser Algen bilden soll. Es zeigte sich, daß die bisher verwendete Na-Acetat-Konzentration von 0,2 % tatsächlich als optimal zu betrachten ist. Die Konzentration der Stickstoffquelle, die meistens 0,1 % betrug, kann jedoch bereits schädlich werden, so daß sich die Anwendung von 0,01 % empfiehlt. K_2HPO_4 und $MgSO_4$ werden zweckmäßig in 0,01 %iger Lösung angewendet, $FeCl_3$ in 0,0001 %, während ein besonderer Zusatz von $CaCl_2$ sich als unnötig erwiesen hat.

Die Bestimmungen der optimalen Aneurinkonzentration ergaben einen Zusatz von 1 γ Aneurin auf 100 ccm Nährlösung als günstig. Höhere Konzentrationen haben eher einen geringeren Erfolg, während mit fallender Konzentration auch der Ernteertrag abnimmt. Die Aneurinwirkung ist jedoch noch bei einer Verdünnung von $1:10^{-12}$ feststellbar.

Nachprüfungen der Angaben von *Lwoff*, daß $FeCl_3$ durch Sterilisieren mit der übrigen Nährlösung unwirksam werde, ergaben die Unhaltbarkeit dieser Behauptung. Das mit der Nährlösung sterilisierte Eisen vermag den Bedarf von *Chilomonas* vollauf zu decken.

Weitere Versuche zeigten, daß Aneurin durch eine Mischung seiner beiden Komponenten Thiazol und Pyrimidin ersetzt werden kann.

Pyrimidin für sich allein stellt keine vermehrungsanregende Substanz dar, Thiazol hat wohl eine ertragsteigernde Wirkung, doch bleibt diese hinter der von Aneurin ziemlich zurück. Es kann nur so sein, daß *Chilomonas* die Fähigkeit zur Thiazolbildung vollständig verloren hat, während das Synthesevermögen für Pyrimidin z. T. noch erhalten geblieben ist.

Endlich konnte durch eine Wiederholung und Erweiterung der Versuche von *Mast* und *Pace* gezeigt werden, daß *Chilomonas* durch einen höheren Kohlensäuregehalt der Atmosphäre wohl in seiner Vermehrung angeregt wird, daß er jedoch nicht imstande ist, aus der Kohlensäure der Luft allein seinen C-Bedarf zu decken. Die Beigabe einer organischen C-Quelle zur Nährlösung ist unerläßlich.

Zusammenfassung.

Es konnte gezeigt werden, daß Aneurin, bzw. ein Gemisch seiner Bausteine Thiazol und Pyrimidin für *Chilomonas paramaecium* einen Wachstumsfaktor darstellt. Es ist durch Pyrimidin allein nicht, durch Thiazol allein nur teilweise zu ersetzen.

Die optimale Dosis beträgt 1 γ Aneurin je 100 ccm Lösung.

Die Behauptung *Lwoffs*, daß Eisen durch die Sterilisation unwirksam werde, konnte als nicht stichhaltig aufgezeigt werden.

Chilomonas wird in seiner Vermehrung durch Kohlensäure günstig beeinflußt, er vermag jedoch auch in CO_2-freier Atmosphäre zu gedeihen und ist keinesfalls zur Kohlensäureassimilation befähigt.

Literatur.

Czurda, V., Beih. z. Bot. Centralbl. Abt. I, **51**, 711, 1933. — *Derselbe*, ebenda **58**, 133, 1935; ebenda S. 158. — *Janke, A.*, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **100**, 409, 1939. — *Knight, B. C. J. G.*, Brit. J. exper. Path. **14**, 112, 1933. — *Derselbe*, ebenda **16**, 315, 1935; Biochem. J. **31**, 731, 1937. — *Lwoff, A.*, u. *E. Lederer*, C. r. Soc. Biol. Paris **119**, 971, 1935. — *Lwoff, A.*, u. *H. Dusi*, A. r. Acad. Sci. Paris **205**, 630, 1937; *dieselben*, ebenda **205**, 756, 1937; ebenda S. 882; C. r. Soc. Biol. Paris **127**, 53, 1938; ebenda **128**, 238, 1938. — *Mast, S. O.*, u. *D. M. Pace*, Protoplasma **20**, 326, 1934. — *Nielsen, N.*, Jahrb. f. Bot. **78**, 125, 1930; C. r. Labor. Carlsberg sér. physiol. **21**, 152, 1935. — *Nielsen, N.*, u. *V. Hartelius*, Biochem. Z. **256**, 2, 1932; C. r. Labor. Carlsberg sér. physiol. **22**, 1, 1937. — *Ondratschek, K.*, Planta **26**, 226, 1936; diese Zeitschr. **11**, 89, 1940; diese Zeitschr. **11**, 219, 1940; diese Zeitschr. **11** (im Druck) 1940. — *Ondratschek, K.*, u. *E. G. Pringsheim*, Beih. z. Bot. Centralbl., Abt. A, **59**, 117, 1939. — *Pringsheim, E. G.*, Planta **26**, 631, 1937; ebenda **26**, S. 665; ebenda **27**, 61, 1937. — *Schopfer, W. H.*, Bull. Soc. bot. suisse **41**, 335, 1932; diese Zeitschr. **5**, 513, 1934; Ber. d. Bot. Ges. **52**, 308, 1934; diese Zeitschr. **6**, 196, 1935; Bull. Soc. bot. suisse **47**, 460, 1937; diese Zeitschr. **9**, 116, 1938; Ergebn. d. Biologie **16**, 1, 1939. — *Schopfer, W. H.*, u. *W. Rytz*, diese Zeitschrift **8**, 244, 1937.

(Institut botanique de l'Université, Bern.)

Recherches sur les facteurs de croissance fongiques dits spécifiques.

Par

W. H. Schopfer.

(Eingegangen am 12. Juni 1940.)

A diverses reprises, il a été question ces derniers temps dans la littérature scientifique, de facteurs de croissance spécifiques pour les champignons. *Janke* (2, 3), p. ex. considère notre facteur *MP*, composé en grande partie par les constituants de l'aneurine, comme spécifique pour les *Mucorinées*. Ce ne peut être le cas étant donné que le mélange pyrimidine + thiazol agit également sur les plantes supérieures.

Le plus intéressant de ces facteurs considérés comme spécifiques est certainement le facteur du groupe B de *Nielsen* obtenu par voie chimique. On sait, depuis les travaux de *Nielsen* et de ses collaborateurs (4), que le développement d'*Aspergillus niger* est fortement accéléré par des substances hydrosolubles, thermostables, résistant à l'oxydation dans les conditions utilisées par *Nielsen*, et non adsorbables par le noir animal (6). Leur plein effet n'est obtenu qu'en présence de co-facteurs de nature minérale. *Nielsen* (7) crée un groupe de facteurs B 2, qui contient ceux agissant sur *Aspergillus* et que nous venons de décrire; ils se distinguent par diverses propriétés des facteurs du groupe B 1, agissant sur la croissance de la *levure*. Ces facteurs d'*Aspergillus* sont répandus dans les tissus animaux et végétaux.

Un facteur analogue peut être obtenu par voie chimique, selon *Nielsen* et *Hartelius* (5), en chauffant à 120° pendant 45 minutes un mélange constitué par 2% de glucose et 2% de tartrate d'ammonium, en présence de papier filtre; ce dernier n'agit que par les éléments minéraux qu'il contient et semble-t-il, non pas en catalysant la formation du facteur B par voie chimique, mais ultérieurement, comme co-facteur de la substance formée par voie chimique. Par ses propriétés, le facteur B 2 formé par voie chimique semble analogue à celui qui naît par voie biologique, dans le milieu de culture de *Rhizopus suinus*. D'autres acides organiques peuvent être utilisés, de même que d'autres monosaccharides tels que le fructose et l'arabinose. Par la même méthode, *Nielsen* et *Dagys* (8) obtiennent un facteur agissant sur la *levure* et supposent que l'autoclavage du glucose et du tartrate d'ammonium fournit de la β-alanine. *Dagys* (1) obtient ce facteur par chauffage du fructose avec le malate d'ammonium; il se produit également par chauffage de la sève de bouleau, qui doit contenir en quantité suffisante l'acide malique, le fructose et l'ammoniaque.

L'action du facteur B 2 sur *Aspergillus* peut être remplacée par un mélange d'acides organiques tels que l'acide glycolique, l'acide glyoxalique et l'acide pyruvique. Les quantités requises sont élevées et l'on peut, pour

l'instant, mettre en doute que pour *Aspergillus*, il s'agisse d'une véritable action de facteur de croissance vitaminique. On peut admettre qu'*Aspergillus* a perdu la propriété de faire la synthèse de certains acides qui lui sont indispensables; ceux-ci doivent lui être offerts; cependant ce critère ne suffit pas pour affirmer la nécessité d'un facteur de croissance véritable.

Umrath (12) a récemment utilisé le facteur B 2 formé par voie chimique d'une manière inattendue et constate avec *Phycomyces Blakesleeanus* les faits suivants: 1) En cultivant *Phycomyces* sur un milieu à base de sulfate d'ammonium et en présence d'un grand excès d'aneurine, le champignon se développe mal. 2) Une adjonction d'extrait de *Rhizopus nigricans* accélère légèrement la croissance. 3) L'hétéroauxine est pour ainsi dire sans effet, utilisée seule ou avec l'extrait de *Rhizopus*. 4. Le facteur B 2 formé par voie chimique manifeste une action extrêmement marquée; celle-ci est à peine influencée par une adjonction d'hétéroauxine, ou d'extrait de *Rhizopus*, ou des deux à la fois.

Umrath (12) conclut que *Phycomyces* a absolument besoin du facteur synthétique B 2 qu'il n'est pas capable de synthétiser. Il reste entendu qu'il s'agit d'un facteur de croissance au sens propre du mot.

Le nombre des expériences est restreint et les conditions n'en sont pas indiquées en détail, de telle sorte qu'il est impossible de se faire une idée précise des résultats indiqués par *Umrath*.

Nous avons montré avec *W. Moser* (10) que l'hétéroauxine est sans effet sur *Phycomyces* et que d'autre part, le sulfate d'ammonium dans un milieu non tamponné, même en présence d'un excès d'aneurine, est une très mauvaise source d'azote. Nous avons, d'autre part étudié en détail l'action des extraits de *Rhizopus*, de *Penicillium*, d'*Aspergillus* divers ainsi que de *Phycomyces* sur le développement de ce dernier champignon.

Avec 25 ccm de milieu, nous obtenons après 12 jours les poids secs suivants: asparagine + 0,8 γ aneurine: 100 mg secs; sulfate de NH_4 + 0,8 γ aneurine: 43 mg secs; *Umrath* obtient avec 50 ccm de milieu (flacon de 300 ccm) et 250 γ d'aneurine, après 37 jours, 45 mg, après 10 jours, 39 mg.

Ce qui nous intéresse dans le court travail d'*Umrath* c'est le fait qu'un nouveau facteur de croissance, non synthétisé par *Phycomyces*, serait nécessaire pour ce dernier. La valeur du test *Phycomyces* pour la détermination de l'aneurine pourrait de la sorte être mise en doute. Nous avons répété les expériences d'*Umrath* avec *Phycomyces*. Les conditions d'expérience sont les suivantes:

Milieu A. Notre milieu habituel: Glucose 30 ‰, asparagine 1 ‰, sulfate de magnésium 0,5 ‰, phosphate acide de potassium 1,5 ‰. Stérilisation 15 minutes à 115°.

Milieu B. de *Umrath*. Glucose 100 ‰, sulfate d'ammonium 4 ‰, sulfate de magnésium 0,5 ‰, phosphate acide de potassium 0,5 ‰. Le sulfate d'ammonium est stérilisé séparément. Facteur synthétique: 2 % glucose et 2 % tartrate d'ammonium sont chauffés pendant 45 minutes à 120° (autoclave). Il n'est pas ajouté aux milieux d'autres éléments minéraux. Un certain nombre est introduit involontairement avec les constituants du liquide nutritif, comme impuretés.

1ère série d'expériences.

Tableau I.

Milieu A. 2 γ d'aneurine pour 25 ccm de milieu; l'optimum d'action est de 0,5 γ.

Milieu sans aneurine	12 mg 14 mg	pas de thalle aérien
Milieu avec aneurine	90 mg	fort thalle aérien
id + $^1/_{10}$ ccm fact. synth.	104 mg	
id + $^5/_{10}$ ccm fact. synth.	100 mg	
id + 1 ccm fact. synth.	109 mg	
id + 2 ccm fact. synth.	122 mg	

Le facteur synthétique B stérile a été ajouté à froid au milieu, sans nouvelle stérilisation.

Tableau I: Dans cette expérience, le facteur synthétique semble exercer une légère stimulation, mais ne conduit pas les cultures à un développement très supérieur à celui que l'on obtient avec aneurine seule.

Tableau II.

Milieu B. Avec 500 γ aneurine pour 25 ccm soit 1000 fois plus que la dose optimale avec le milieu A.

dose de facteur synthétique	0	1	2	3	4 ccm
poids sec récolte	17	68	104	129	137 mg
	19	68	104	124	144 mg
	14	69	104	128	149 mg
	17	69	103	137	149 mg

Tableau II: Sans facteur synthétique: faible émersion de thalle aérien en touffe, riche en carotène, analogue à celui que nous avons signalé en 1934. A partir de 1 ccm développement progressif du thalle aérien.

Il est indiscutable qu'avec le milieu B, le facteur dit synthétique exerce une action très marquée.

2ème série d'expériences.

Tableau III.

Action du facteur synthétique B 2 avec le milieu A, sans aneurine, en relation avec la stérilisation. (25 ccm de milieu.)

Milieu A, sans aneurine		
+ 1 ccm fact. synth.	non stérilisé	7, 4, 4, 4, 4, 4 mg
	stérilisé avec le milieu	4, 4, 4, 3, 6 mg
+ 2 ccm fact. synth.	non stérilisé	5, 5, 5, 7, 6, 6 mg
	stérilisé	3, 3, 4, 5 mg
+ 4 ccm fact. synth.	non stérilisé	4, 4, 4, 4, 5 mg
	stérilisé	4, 3, 4, 5 mg

Tableau III: Nulle part, production de thalle aérien. Dans le milieu A, sans aneurine, le facteur synthétique n'agit pas.

3ème série d'expériences.

Tableau IV.

Milieu A, sans aneurine		
+ 2 ccm tartrate	non stérilisé	13, 10, 11 mg
	stérilisé avec le milieu	10, 10, 9 mg
+ 4 ccm tartrate	non stérilisé	10, 10, 9 mg
	stérilisé	17, 17, 14 mg
+ 6 ccm tartrate	non stérilisé	17, 17, 17 mg
	stérilisé	20, 20, 20 mg

Tableau IV: Le tartrate est utilisé seul, au lieu du facteur synthétique. Il est à la concentration de 1 %, et a subi auparavant la température de 120° pendant 45 minutes. Faible stimulation sous l'influence du tartrate, stérilisé ou non avec le milieu; nulle part production de thalle aérien.

Tableau V.

	0	1	2	3	4 ccm
Milieu B avec 500 γ aneurine					
+ tartrate NH_4 à 1 %	14	78	109	120	129 mg
+ asparagine 1 %	13	66	79	114	110 mg

Tableau V: Le tartrate d'ammonium seul, ajouté au milieu B avec excès d'aneurine, agit très fortement; il en est de même lorsqu'on ajoute une autre source azotée telle que l'asparagine. Il est indiscutable que le facteur synthétique de *Nielsen*, utilisé par *Umrath*, n'agit pas par une action de facteur de croissance mais bien en fournissant au champignon une source d'azote plus favorable que le sulfate d'ammonium.

4ème série d'expériences.

Le tartrate d'ammonium a subi auparavant une adsorption par le noir animal; celle-ci a pour but de débarrasser la substance de ses impuretés organiques. La très grande majorité des produits naturels exerçant une action favorable sur *Phycomyces* sont inactivés par ce traitement. Après adsorption, le facteur synthétique est fabriqué selon la méthode habituelle.

Tableau VI.

fact. synth.	0	1	2	4	6 ccm
avec milieu A, sans vitam	13	15	21	20	— mg
	11	15	17	19	— mg
	13	15	21	21	— mg
avec milieu B + 500 γ aneurine	20	31	80	123	233 mg
	27	27	86	127	243 mg

Tableau VI: Avec A, pas de thalle aérien, avec B, production croissante de thalle aérien.

Les résultats, dans leurs grandes lignes, confirment ceux des expériences précédentes: légère stimulation avec le milieu A, très forte accélération de croissance avec le milieu B. Il semble même que le facteur synthétique B préparé avec du tartrate ayant subi l'adsorption agit plus favorablement, peut-être parce que l'adsorbant a éliminé du sel d'ammonium quelque substance toxique ou légèrement inhibitrice.

L'explication des phénomènes observés par *Umrath* est dès lors facile à donner.

En 1935 (9, 11) déjà, nous avions montré qu'il existait entre la dose d'asparagine présente dans le milieu et celle d'aneurine, des relations quantitatives indiscutables. Elles sont même tellement nettes qu'elles ont pu faire croire, à un moment donné, à une intervention de la vitamine B 1 dans le métabolisme de l'azote. Ces relations s'expriment par les faits suivants: avec 0,5 $^0/_{00}$ d'asparagine, la dose optimale correspondante d'aneurine est de 0,2 γ; avec 1 $^0/_{00}$, elle monte à 0,5—0,6 γ.

Si donc, nous avons dans le milieu un grand excès d'aneurine, ce sera la dose insuffisante d'asparagine qui jouera le rôle de facteur limitant. Au contraire, en présence d'une dose faible d'aneurine et d'un excès d'asparagine, ce sera l'aneurine qui fonctionnera comme facteur limitant. Cela revient à dire qu'avec 0,2 γ d'aneurine, il ne sert à rien d'augmenter la dose d'asparagine qui n'aura pas l'action que l'on attend. Au point optimal, avec des doses correspondantes d'asparagine et d'aneurine, sans excès de l'une ni de l'autre le rapport: aneurine/poids sec culture est relativement constant (25 ccm de milieu), tableau VII.

Tableau VII.

$^0/_{00}$ asparagine	aneurine optim.	poids sec récolte	rapport $\frac{\text{aneurine}}{\text{poids récolte}}$
0,1 mg	0,05 γ	10 mg	0,005
0,5	0,2	40	0,0051
1	0,6	90	0,0068
4	1	190	0,0052

Un milieu contenant une dose supraoptimale d'aneurine, mais une quantité insuffisante de source azotée donnera un développement faible du microorganisme; toute adjonction de substance azotée assimilable conduira à une amélioration immédiate de la croissance. L'expérience suivante le témoigne.

Le milieu est à base de glucose 3 %, et d'asparagine 1 $^0/_{00}$; la dose suffisante d'aneurine permettant le développement optimum est de 0,5 γ; le milieu en contient 100 fois plus, soit 50 γ pour 25 ccm. A ce milieu sont ajoutées, à froid et sans stérilisation avec le milieu, les substances azotées suivantes (tableau VIII):

Tableau VIII.

	0	1	5	10	20	40 mg
tartrate NH_4	105	95	101	106	97	102 mg
sulfate NH_4	92	95	85	88	101	90 mg
glycocolle	92	92	94	107	107	124 mg
d, l-alanine	97	97	103	113	134	161 mg
d, l-leucine	90	94	106	108	119	146 mg
asparagine	98	97	115	115	142	172 mg
acide glutamique ...	99	94	94	94	98	114 mg

Le tartrate et le sulfate d'ammonium n'agissent pas; les acides aminés par contre, surtout la leucine, de même que l'asparagine s'ajoutant à celle contenue dans le milieu sont très actives. Chose curieuse l'acide glutamique n'a presque pas d'action. Dans ces conditions: dose supra-optimale d'aneurine et infraoptimale d'asparagine, on est en droit de dire que la substance azotée active ajoutée fonctionne comme co-facteur de croissance. Avec 5 mg d'asparagine supplémentaire pour 25 ccm de milieu, l'effet est déjà appréciable.

L'action favorisante augmentera parallèlement à la quantité supplémentaire d'asparagine fournie, théoriquement jusqu'à ce qu'elle ait atteint l'optimum requis par 50 γ d'aneurine; pratiquement, pour d'autres raisons, l'effet favorisant sera arrêté avant. Nous admettons que ces sources azotées supplémentaires agissent par l'azote assimilable qu'elles contiennent, et non pas par quelque impureté-métal ou autre-qu'elles pourraient introduire dans le milieu.

Dans les expériences d'*Umrath*, la source d'azote offerte à *Phycomyces* est l'une des moins favorables de toutes et l'aneurine s'y trouve en grand excès; il est donc clair que toute adjonction de matériel azoté assimilable — mieux que ne l'est le sulfate d'ammonium — ce qui est le cas avec le tartrate d'ammonium, se marquera par une forte accélération de la croissance.

Avec un milieu pauvre en azote assimilable et riche en aneurine toute substance azotée assimilable introduite fonctionnera comme „co-facteur" de croissance.

Comme nous l'avons signalé déjà, c'est ce fait qui peut apporter des troubles dans la détermination de l'aneurine au moyen du test *Phycomyces*; si la détermination se fait avec une substance impure, riche en azote, l'action de celui-ci s'ajoutera à celle de l'azote présent initialement dans le milieu: les poids obtenus seront supérieurs à ceux que l'on s'attend à observer et les comparaisons avec les courbes standards (vitamine seule!) ne pourront être faites avec précision.

Pour la détermination de l'aneurine au moyen du test *Phycomyces*, il est indispensable que le milieu contienne la meilleure source possible

d'azote; dans ce cas, l'effet de l'azote introduit avec la substance impure ne se marquera pas, ou que beaucoup plus faiblement. Avec des petites quantités de substances, une détermination exacte reste possible.

Conclusions.

1. Le sulfate d'ammonium, dans un milieu non tamponné est une mauvaise source d'azote. Le mélange dit „facteur synthétique" de *Nielsen* n'agit pas comme facteur de croissance au sens propre du mot, mais par l'azote assimilable — tartrate d'ammonium — qu'il introduit. Il n'y a pas pour *Phycomyces*, „de facteur synthétique B 2 que le champignon est dans l'incapacité de synthétiser et qu'il faut lui offrir".

2. Pour l'instant, il faut considérer comme facteur de croissance véritable de nature vitaminique, pour *Phycomyces*

a) l'aneurine, facteur essentiel;

b) un facteur *MP*, thermostable, relativement alcalistable, représenté en partie par l'ensemble pyrimidine + thiazol;

c) un élément non déterminé, agissant faiblement, faisant partie du complexe *MP*, autre que la pyrimidine et le thiazol;

d) un ensemble de conditions spéciales, requises pour que les phénomènes sexuels puissent se manifester, mis en évidence par *Robbins* (8a), et confirmé par nous-même;

e) de plus, dans certaines conditions de milieu, définies plus haut, une petite quantité de substance azotée assimilable peut jouer le rôle de co-facteur de croissance.

Travaux cités.

1) *J. Dagys*, C. r. Trav. Lab. Carlsberg, série physiologique **23**, 1, 1940. — 2) *A. Janke*, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **100**, 409, 1939. — 3) *A. Janke* u. *F. Sorgo*, Arch. f. Mikrobiol. **10**, 265, 1939. — 4) *N. Nielsen*, C. r. Trav. Lab. Carlsberg 19, no. 5, 1931. — 5) *N. Nielsen* u. *V. Hartelius*, Biochem. Zeitschr. **256**, 2, 1932. — 6) *N. Nielsen* u. *V. Hartelius*, C. r. Trav. Lab. Carlsberg 19, no. 8, 1932. — 7) *N. Nielsen* u. *V. Hartelius*, C. r. Trav. Lab. Carlsberg, série physiologique 22, no. 1, 1937. — 8) *N. Nielsen* u. *J. Dagys*, C. r. Trav. Lab. Carlsberg, série physiologique 22, 447, 1940. — 8a) *W. J. Robbins*, Bot. Gazette, **101**, 428, 1939. — 9) *W. H. Schopfer*, Arch. f. Mikrobiol. **6**, 510, 1935. — 10) *W. H. Schopfer* et *W. Moser*, Protoplasma (Berl.) **26**, 538, 1936. — 11) *W. H. Schopfer*, Ergebn. d. Biol. **16**, 1—172, 1939. — 12) *K. Umrath*, Protoplasma **33**, 13, 1939.

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.)

Energetische Betrachtungen zur Ökonomie der Fettbildung bei Mikroorganismen.

Von

August Rippel.

(Eingegangen am 15. Juni 1940.)

Die vorliegende Mitteilung soll sich nicht mit der Energetik der Fettbildung bei Mikroorganismen als Einzelvorgang beschäftigen, also auch nicht mit dem Chemismus, sondern es soll versucht werden, von rein energetischen Gesichtspunkten aus festzustellen, welche Mengen von Fett durch Mikroorganismen aus einer bestimmten Menge von Kohlehydraten *im Rahmen des gesamten Lebensvorganges* gebildet werden können und wieweit die so erhaltenen Ergebnisse in Einklang mit vorliegenden Versuchsergebnissen stehen. Es ist klar, daß solche grundsätzlichen Überlegungen als Richtschnur für ein weiteres Arbeiten dienen können, insofern als sie geeignet sein können, einen gewissen Leerlauf in den Untersuchungen vermeiden zu helfen.

Es sei dabei definiert der „*Fettkoeffizient*" als die je 100 g durch den Organismus verarbeitete Kohlenstoffquelle gebildete Menge an Fett, wobei sich die vorliegenden Betrachtungen allerdings auf Glucose als Kohlenstoffquelle beschränken soll. Die Bezeichnung entspricht dem von mir definierten „*Eiweißkoeffizienten*" (*Rippel* und *Nabel*) und dem „*ökonomischen Koeffizienten*" von *Pfeffer*, wobei der ökonomische Koeffizient bekanntlich die Summe *aller* aus verarbeitetem Kohlenstoffmaterial gebildeten Zellbestandteile umfaßt und von mir ebenfalls auf 100 g verarbeitete Kohlenstoffquelle bezogen ist (vgl. *Pellegrini*, S. 546).

Als Grundlage dienen die kalorischen Werte, bezogen auf Glucose = 1, für Fett also 2,5, für Eiweiß 1,5. Für die sonstigen Zellbestandteile ist der kalorische Wert von 1 angenommen, was sicherlich nicht ganz richtig ist in Anbetracht der Tatsache, daß z. B. der etwas energiereichere Mannit (S. 279), um nur einen Fall zu erwähnen, bei Mikroorganismen als häufiger Reservestoff angetroffen wird. Aber solche Fehler können nicht sehr groß sein, und eine absolut zutreffende Erfassung ist naturgemäß nicht möglich. Für die Aschenbestandteile ist der Wert 0 eingesetzt. Auch dieser kann nicht ganz zutreffend sein, da Sulfate der Nährlösung durch Reduktion einen Energiehub erfahren. Indessen ist hier die Menge absolut so gering, daß der Fehler keineswegs größer als 1 % sein dürfte, somit vernachlässigt werden kann.

Alle solchen an sich schon kleinen Fehler werden aber weiterhi dadurch wenigstens bis zu einem gewissen Grade kompensiert, daß sic das Entstehen energiereicherer oder energieärmerer Produkte (ii Vergleich zur Glucose) naturgemäß in einem Fallen bzw. Sinken de ökonomischen Koeffizienten ausdrücken muß, der zunächst die Grunc lage für die weiteren Berechnungen bildet, wie später ausgeführt werde wird.

Für uns handelt es sich nun darum zuzusehen, wie sich die energet schen Verhältnisse bzw. Möglichkeiten ändern, wenn sich die Zusammer setzung des Körpers der Mikroorganismen in Hinsicht auf den Fettgehal ändert. Da es sich uns weiterhin um den *Gesamtumsatz* handelt, de jeweils im Maximum erreicht wird, spielen Betrachtungen keine Rolle wie sie etwa von *Tamiya* angestellt wurden: Ob nämlich die Bildun einer bestimmten Menge Fett aus Kohlenhydrat exotherm verläuft wie dieser Autor annimmt, oder endotherm, nach anderen Anschauungen In beiden Fällen würde sich lediglich die Menge der zur Bildung eine bestimmten Menge Fett *unmittelbar* verwendeten Kohlenhydrat ändern, nicht aber der Gesamtumsatz des Organismus. Denn de Gesamtumsatz an Energie muß der gleiche bleiben, gleichgültig, wievie *unmittelbar* an Kohlehydrat in die Fettbildung hineingesteckt wird In den beiden folgenden von *Tamiya* erörterten Formeln

I	Ältere Anschauung	190 g Hexose → 100 g Fett + 236 kcal,
II	*Tamiya*	270 g Hexose → 100 g Fett − 65 kcal

müßte bei I die Energiezuwendung durch Umsatz an anderer Stelle ermöglicht werden, bei II dagegen die Energie für andere Stellen ver fügbar werden, wobei in Hinsicht auf den Gesamtumsatz die Form gleichgültig bleibt. In diesem Gesamtumsatz ergeben sich bei beiden Formeln natürlich die gleichen Werte:

I 100g Fett = 950kcal; 190g Hexose = 714kcal + 236kcal = 950kcal,
II 100g Fett = 950kcal; 270g Hexose = 1015kcal − 65kcal = 950kcal.

Das ist, wie gesagt, selbstverständlich; ich halte es aber für notwendig, dies ausdrücklich auseinanderzusetzen, da sonst meine Ausführungen in Hinsicht auf die erwähnten Vorstellungen hie und da mißverstanden werden könnten. Wir können also für unsere Betrachtung ohne weiteres die Gesamtmenge an Energie einsetzen.

Tabelle I zeigt zunächst eine energetische Berechnung, die so durchgeführt ist, daß jeweils 10, 20, 30, 40, 50 oder 60 % Fett, bezogen auf Trockensubstanz, angenommen werden. Für jeden verschiedenen %igen Fettgehalt ist nun ein verschiedener *ökonomischer Koeffizient* angenommen (Spalte 1), der zwischen 20 und 80 liegt. Dieser ökonomische Koeffizient, der ja die je 100 g verarbeiteten Zuckers gebildete Menge an Trockensubstanz angibt, ergibt unter Zugrundelegung des angenommenen

Tabelle I.

1 Ökonomischer Koeffizient	2 Fettkoeffizient	3 Eiweißkoeffizient	4 Asche	5 Sonstige organische Bestandteile	6 Kalorischer Wert von Fett	7 Kalorischer Wert von Eiweiß	8 Kalorische Summe 5—7
			Für 10 % Fett in der Trockensubstanz.				
80	8	24	6	42	20	36	98
70	7	21	5,25	36,75	17,5	31,5	85,75
60	6	18	4,5	31,5	15	27	73,5
50	5	15	3,75	26,25	12,5	22,5	61,25
40	4	12	3	21	10	18	49
30	3	9	2,25	15,75 (= 52,5 %)	7,5	13,5	36,75
			Für 20 % Fett in der Trockensubstanz.				
80	16	24	6	34	40	36	110
70	14	21	5,25	29,75	35	31,5	96,25
60	12	18	4,5	25,5	30	27	82,5
50	10	15	3,75	21,25	25	22,5	68,75
40	8	12	3	17	20	18	55
30	6	9	2,25	12,75 (= 42,5 %)	15	13,5	41,25
			Für 30 % Fett in der Trockensubstanz.				
80	24	24	6	26	60	36	122
70	21	21	5,25	22,75	52,5	31,5	106,75
60	18	18	4,5	19,5	45	27	91,5
50	15	15	3,75	16,25	37,5	22,5	76,25
40	12	12	3	13	30	18	61
30	9	9	2,25	9,75 (= 32,5 %)	22,5	13,5	45,75
			Für 40 % Fett in der Trockensubstanz.				
80	32	24	6	18	80	36	134
70	28	21	5,25	15,75	70	31,5	117,25
60	24	18	4,5	13,5	60	27	100,5
50	20	15	3,75	11,25	50	22,5	83,75
40	16	12	3	9	40	18	67
30	12	9	2,25	6,75	30	13,5	50,25
20	8	6	1,5	4.5 (= 22,5 %)	20	9	33,5
			Für 50 % Fett in der Trockensubstanz.				
80	40	24	6	10	100	36	146
70	35	21	5,25	8,75	87,5	31,5	127,75
60	30	18	4,5	7,5	75	27	109,5
50	25	15	3,75	6,25	62,5	22,5	91,25
40	20	12	3	5	50	18	73
30	15	9	2,25	3,75	37,5	13,5	54,75
20	10	6	1,5	2,5 (= 12,5 %)	25	9	36,5

d'azote; dans ce cas, l'effet de l'azote introduit avec la substance impure ne se marquera pas, ou que beaucoup plus faiblement. Avec des petites quantités de substances, une détermination exacte reste possible.

Conclusions.

1. Le sulfate d'ammonium, dans un milieu non tamponné est une mauvaise source d'azote. Le mélange dit ,,facteur synthétique" de *Nielsen* n'agit pas comme facteur de croissance au sens propre du mot, mais par l'azote assimilable — tartrate d'ammonium — qu'il introduit. Il n'y a pas pour *Phycomyces*, ,,de facteur synthétique B 2 que le champignon est dans l'incapacité de synthétiser et qu'il faut lui offrir".

2. Pour l'instant, il faut considérer comme facteur de croissance véritable de nature vitaminique, pour *Phycomyces*

a) l'aneurine, facteur essentiel;
b) un facteur *MP*, thermostable, relativement alcalistable, représenté en partie par l'ensemble pyrimidine + thiazol;
c) un élément non déterminé, agissant faiblement, faisant partie du complexe *MP*, autre que la pyrimidine et le thiazol;
d) un ensemble de conditions spéciales, requises pour que les phénomènes sexuels puissent se manifester, mis en évidence par *Robbins* (8a), et confirmé par nous-même;
e) de plus, dans certaines conditions de milieu, définies plus haut, une petite quantité de substance azotée assimilable peut jouer le rôle de co-facteur de croissance.

Travaux cités.

1) *J. Dagys*, C. r. Trav. Lab. Carlsberg, série physiologique **23**, 1, 1940. — 2) *A. Janke*, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **100**, 409, 1939. — 3) *A. Janke* u. *F. Sorgo*, Arch. f. Mikrobiol. **10**, 265, 1939. — 4) *N. Nielsen*, C. r. Trav. Lab. Carlsberg **19**, no. 5, 1931. — 5) *N. Nielsen* u. *V. Hartelius*, Biochem. Zeitschr. **256**, 2, 1932. — 6) *N. Nielsen* u. *V. Hartelius*, C. r. Trav. Lab. Carlsberg **19**, no. 8, 1932. — 7) *N. Nielsen* u. *V. Hartelius*, C. r. Trav. Lab. Carlsberg, série physiologique **22**, no. 1, 1937. — 8) *N. Nielsen* u. *J. Dagys*, C. r. Trav. Lab. Carlsberg, série physiologique **22**, 447, 1940. — 8a) *W. J. Robbins*, Bot. Gazette, **101**, 428, 1939. — 9) *W. H. Schopfer*, Arch. f. Mikrobiol. **6**, 510, 1935. — 10) *W. H. Schopfer* et *W. Moser*, Protoplasma (Berl.) **26**, 538, 1936. — 11) *W. H. Schopfer*, Ergebn. d. Biol. **16**, 1—172, 1939. — 12) *K. Umrath*, Protoplasma **33**, 13, 1939.

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.)

Energetische Betrachtungen zur Ökonomie der Fettbildung bei Mikroorganismen.

Von

August Rippel.

(Eingegangen am 15. Juni 1940.)

Die vorliegende Mitteilung soll sich nicht mit der Energetik der Fettbildung bei Mikroorganismen als Einzelvorgang beschäftigen, also auch nicht mit dem Chemismus, sondern es soll versucht werden, von rein energetischen Gesichtspunkten aus festzustellen, welche Mengen von Fett durch Mikroorganismen aus einer bestimmten Menge von Kohlehydraten *im Rahmen des gesamten Lebensvorganges* gebildet werden können und wieweit die so erhaltenen Ergebnisse in Einklang mit vorliegenden Versuchsergebnissen stehen. Es ist klar, daß solche grundsätzlichen Überlegungen als Richtschnur für ein weiteres Arbeiten dienen können, insofern als sie geeignet sein können, einen gewissen Leerlauf in den Untersuchungen vermeiden zu helfen.

Es sei dabei definiert der „*Fettkoeffizient*" als die je 100 g durch den Organismus verarbeitete Kohlenstoffquelle gebildete Menge an Fett, wobei sich die vorliegenden Betrachtungen allerdings auf Glucose als Kohlenstoffquelle beschränken soll. Die Bezeichnung entspricht dem von mir definierten „*Eiweißkoeffizienten*" (*Rippel* und *Nabel*) und dem „*ökonomischen Koeffizienten*" von *Pfeffer*, wobei der ökonomische Koeffizient bekanntlich die Summe *aller* aus verarbeitetem Kohlenstoffmaterial gebildeten Zellbestandteile umfaßt und von mir ebenfalls auf 100 g verarbeitete Kohlenstoffquelle bezogen ist (vgl. *Pellegrini*, S. 546).

Als Grundlage dienen die kalorischen Werte, bezogen auf Glucose = 1, für Fett also 2,5, für Eiweiß 1,5. Für die sonstigen Zellbestandteile ist der kalorische Wert von 1 angenommen, was sicherlich nicht ganz richtig ist in Anbetracht der Tatsache, daß z. B. der etwas energiereichere Mannit (S. 279), um nur einen Fall zu erwähnen, bei Mikroorganismen als häufiger Reservestoff angetroffen wird. Aber solche Fehler können nicht sehr groß sein, und eine absolut zutreffende Erfassung ist naturgemäß nicht möglich. Für die Aschenbestandteile ist der Wert 0 eingesetzt. Auch dieser kann nicht ganz zutreffend sein, da Sulfate der Nährlösung durch Reduktion einen Energiehub erfahren. Indessen ist hier die Menge absolut so gering, daß der Fehler keineswegs größer als 1 % sein dürfte, somit vernachlässigt werden kann.

Alle solchen an sich schon kleinen Fehler werden aber weiterhin dadurch wenigstens bis zu einem gewissen Grade kompensiert, daß sich das Entstehen energiereicherer oder energieärmerer Produkte (im Vergleich zur Glucose) naturgemäß in einem Fallen bzw. Sinken des ökonomischen Koeffizienten ausdrücken muß, der zunächst die Grundlage für die weiteren Berechnungen bildet, wie später ausgeführt werden wird.

Für uns handelt es sich nun darum zuzusehen, wie sich die energetischen Verhältnisse bzw. Möglichkeiten ändern, wenn sich die Zusammensetzung des Körpers der Mikroorganismen in Hinsicht auf den Fettgehalt ändert. Da es sich uns weiterhin um den *Gesamtumsatz* handelt, der jeweils im Maximum erreicht wird, spielen Betrachtungen keine Rolle, wie sie etwa von *Tamiya* angestellt wurden: Ob nämlich die Bildung einer bestimmten Menge Fett aus Kohlenhydrat exotherm verläuft, wie dieser Autor annimmt, oder endotherm, nach anderen Anschauungen. In beiden Fällen würde sich lediglich die Menge der zur Bildung einer bestimmten Menge Fett *unmittelbar* verwendeten Kohlenhydrate ändern, nicht aber der Gesamtumsatz des Organismus. Denn der Gesamtumsatz an Energie muß der gleiche bleiben, gleichgültig, wieviel *unmittelbar* an Kohlehydrat in die Fettbildung hineingesteckt wird. In den beiden folgenden von *Tamiya* erörterten Formeln

I Ältere Anschauung 190 g Hexose → 100 g Fett + 236 kcal,
II *Tamiya* 270 g Hexose → 100 g Fett − 65 kcal

müßte bei I die Energiezuwendung durch Umsatz an anderer Stelle ermöglicht werden, bei II dagegen die Energie für andere Stellen verfügbar werden, wobei in Hinsicht auf den Gesamtumsatz die Form gleichgültig bleibt. In diesem Gesamtumsatz ergeben sich bei beiden Formeln natürlich die gleichen Werte:

I 100g Fett = 950kcal; 190g Hexose = 714kcal + 236kcal = 950kcal,
II 100g Fett = 950kcal; 270g Hexose = 1015kcal − 65kcal = 950kcal.

Das ist, wie gesagt, selbstverständlich; ich halte es aber für notwendig, dies ausdrücklich auseinanderzusetzen, da sonst meine Ausführungen in Hinsicht auf die erwähnten Vorstellungen hie und da mißverstanden werden könnten. Wir können also für unsere Betrachtung ohne weiteres die Gesamtmenge an Energie einsetzen.

Tabelle I zeigt zunächst eine energetische Berechnung, die so durchgeführt ist, daß jeweils 10, 20, 30, 40, 50 oder 60 % Fett, bezogen auf Trockensubstanz, angenommen werden. Für jeden verschiedenen %igen Fettgehalt ist nun ein verschiedener *ökonomischer Koeffizient* angenommen (Spalte 1), der zwischen 20 und 80 liegt. Dieser ökonomische Koeffizient, der ja die je 100 g verarbeiteten Zuckers gebildete Menge an Trockensubstanz angibt, ergibt unter Zugrundelegung des angenommenen

Tabelle I.

1 Ökonomischer Koeffizient	2 Fettkoeffizient	3 Eiweißkoeffizient	4 Asche	5 Sonstige organische Bestandteile	6 Kalorischer Wert von Fett	7 Kalorischer Wert von Eiweiß	8 Kalorische Summe 5—7
			Für 10 % Fett in der Trockensubstanz.				
80	8	24	6	42	20	36	98
70	7	21	5,25	36,75	17,5	31,5	85,75
60	6	18	4,5	31,5	15	27	73,5
50	5	15	3,75	26,25	12,5	22,5	61,25
40	4	12	3	21	10	18	49
30	3	9	2,25	15,75 (= 52,5 %)	7,5	13,5	36,75
			Für 20 % Fett in der Trockensubstanz.				
80	16	24	6	34	40	36	110
70	14	21	5,25	29,75	35	31,5	96,25
60	12	18	4,5	25,5	30	27	82,5
50	10	15	3,75	21,25	25	22,5	68,75
40	8	12	3	17	20	18	55
30	6	9	2,25	12,75 (= 42,5 %)	15	13,5	41,25
			Für 30 % Fett in der Trockensubstanz.				
80	24	24	6	26	60	36	122
70	21	21	5,25	22,75	52,5	31,5	106,75
60	18	18	4,5	19,5	45	27	91,5
50	15	15	3,75	16,25	37,5	22,5	76,25
40	12	12	3	13	30	18	61
30	9	9	2,25	9,75 (= 32,5 %)	22,5	13,5	45,75
			Für 40 % Fett in der Trockensubstanz.				
80	32	24	6	18	80	36	134
70	28	21	5,25	15,75	70	31,5	117,25
60	24	18	4,5	13,5	60	27	100,5
50	20	15	3,75	11,25	50	22,5	83,75
40	16	12	3	9	40	18	67
30	12	9	2,25	6,75	30	13,5	50,25
20	8	6	1,5	4.5 (= 22,5 %)	20	9	33,5
			Für 50 % Fett in der Trockensubstanz.				
80	40	24	6	10	100	36	146
70	35	21	5,25	8,75	87,5	31,5	127,75
60	30	18	4,5	7,5	75	27	109,5
50	25	15	3,75	6,25	62,5	22,5	91,25
40	20	12	3	5	50	18	73
30	15	9	2,25	3,75	37,5	13,5	54,75
20	10	6	1,5	2,5 (= 12,5 %)	25	9	36,5

Tabelle I (Fortsetzung).

1 Ökonomischer Koeffizient	2 Fettkoeffizient	3 Eiweißkoeffizient	4 Asche	5 Sonstige organische Bestandteile	6 Kalorischer Wert von Fett	7 Kalorischer Wert von Eiweiß	8 Kalorische Summe 5—7
Für 60 % Fett in der Trockensubstanz.							
80	48	24	6	2	120	36	158
70	42	21	5,25	1,75	105	31,5	138,25
60	36	18	4,5	1,5	90	27	118,5
50	30	15	3,75	1,25	75	22,5	98,75
40	24	12	3	1	60	18	79
30	18	9	2,25	0,75	45	13,5	59,25
20	12	6	1,5	0,5 (= 2,5 %)	30	9	39,5

Angenommen sind 30 % Eiweiß.

%igen Fettgehalts den *Fettkoeffizienten* (Spalte 2) und ferner den *Eiweißkoeffizienten* (Spalte 3), wobei in diesem Falle stets 30 % Eiweiß angenommen sind.

Spalte 4 zeigt den entsprechend berechneten *Aschengehalt*, wobei stets 7,5 % Asche angenommen sind. Die Summe der Spalten 2 bis 4 ergibt, von dem jeweiligen ökonomischen Koeffizienten abgezogen, die *sonstigen organischen Bestandteile* (Spalte 5), die auf 100 g verarbeiteten Zucker gebildet sind.

Spalte 6 ergibt den *kalorischen Wert von Fett*, gewonnen durch Multiplikation der Zahl des Fettkoeffizienten in Spalte 2 mit 2,5, Spalte 7 den *kalorischen Wert von Eiweiß*, gewonnen durch Multiplikation der Zahl des Eiweißkoeffizienten in Spalte 3 mit 1,5. Die Summen der Spalten 5 bis 7, die sich in Spalte 8 finden, ergeben die *gesamte kalorische Beanspruchung* zur Bildung dieser Stoffe, wobei Spalte 5, wie oben gesagt, den kalorischen Verhältniswert 1 erhält.

Diese Zahlen der Spalte 8 geben uns also an, daß unter Voraussetzung einer Verarbeitung von 100 g Zucker, deren kalorischer Wert = 100 gesetzt ist, die angegebenen Kalorien aufgewendet werden müßten, damit sich die für verschiedene ökonomische Koeffizienten und bei verschiedenem %igen Fettgehalt ergebenden Mengen an Fett, Eiweiß und sonstigen Zellbestandteilen bilden könnten. Der Wert 100 kann natürlich nicht erreicht werden, da der Organismus ja Kalorien im Betriebsstoffwechsel verbraucht. Nach *Flieg* (*Aspergillus niger*) und *Schmidt* (*Oospora lactis*) würde sich dieser Wert auf rund 40 stellen, was also einem ökonomischen Koeffizienten von rund 60 entsprechen würde. Um für unsere Berechnung unter allen Umständen nicht zu günstig zu rechnen, wollen wir den Atmungswert zu 30 annehmen. Das bedeutet aber, daß alle Werte der Spalte 8, die über 70 liegen, praktisch

nicht möglich sind. Auf diese Weise fallen also alle Werte der Spalte 8, die durch die Umrahmung kenntlich gemacht sind, aus.

Im höchsten Falle ergäbe sich danach bei 60 % Fett und einem ökonomischen Koeffizienten von 30 ein Fettkoeffizient von 18, also 18 g Fett auf 100 g verarbeiteten Zucker, was natürlich einstweilen nur für die in Tabelle I angenommenen Fett- und Eiweißzahlen gilt.

Aber auch dieser Wert des Fettkoeffizienten dürfte für diese Stelle nicht möglich sein. Denn laut Spalte 5 würde für die sonstigen organischen Zellbestandteile ein Energiewert von nur 0,75 übrig bleiben. Diese Zahl, in Prozenten der Trockensubstanz ausgedrückt, würde 2,5 % bedeuten. Es dürfte aber wohl unmöglich sein, daß lediglich 2,5 % der Trockensubstanz aus sonstigen organischen Zellbestandteilen bestehen, der nächstniedrige Wert, nämlich Fettkoeffizient 16 bei 40 % Fett und dem ökonomischen Wert 40, könnte dagegen als eben möglich erscheinen, da auf die sonstigen organischen Zellbestandteile 22,5 % entfielen, ein Wert, der aber auch noch etwas niedrig erscheint. *Tamiya* rechnet jedenfalls mit einem Wert von 45 für diese Bestandteile, bei allerdings geringerem Fettgehalt (20 %, S. 254). Zusammenfassend läßt sich sagen, daß für die in Tabelle II angenommenen Verhältnisse die Grenze des möglich erscheinenden Fettkoeffizienten bei rund 15 liegt.

Eine Möglichkeit, zu einem noch höheren Fettkoeffizienten zu kommen, besteht offenbar nur dann, wenn der Eiweißgehalt gesenkt wird. Tabelle II gibt nun eine solche Berechnung, die folgendermaßen vorgenommen ist:

Für die Fettprozente 20 bis 60 ist der Eiweißgehalt variiert von 10 bis 70 %, und zwar für verschiedene, in der Tabelle angegebene ökonomische Koeffizienten. Dabei ist die Rechnung für Eiweißprozente nur so weit durchgeführt, wie sich keine negativen Werte in Spalte 5 ergeben; der Fall ist dann praktisch natürlich unmöglich. An und für sich kommt es hier ja auch nicht auf die hohen, sondern auf die niederen Eiweißwerte an.

Die Tabelle II zeigt, unter der oben gemachten Annahme, daß auf den Energiestoffwechsel der Wert 30 entfällt, folgendes: Für 20 % Fett erscheint ein Fettkoeffizient von 10 möglich, während der Fettkoeffizient 12 nicht mehr realisierbar zu sein scheint. Da nicht mit Zwischenwerten des ökonomischen Koeffizienten gerechnet ist, so würde allerdings, bei Zugrundelegung des ökonomischen Koeffizienten 55 ein Fettkoeffizient von 11 eben noch möglich sein, wie ein Überschlag zeigt. Für einen Fettgehalt von 30 % kommen wir zu dem extremen Wert von 12, bzw. bei Berücksichtigung der Zwischenstufen des ökonomischen Koeffizienten auf fast 15. Für den Fettgehalt von 40 % erhalten wir den Fettkoeffizienten 16 (bzw. etwa 18), für 50 % Fett kann eben der Fettkoeffizient 20 erreicht werden, für 60 % Fett ergibt sich wieder

Tabelle II.

Ökonomischer Koeffizient	1 Eiweiß in %	2 Fett-koeffizient	3 Eiweiß-koeffizient	4 Asche	5 Sonstige organische Bestandteile	6 Kalorischer Wert von Fett	7 Kalorischer Wert von Eiweiß	8 Kalorische Summe 5—7
Fett 20 % der Trockensubstanz.								
40	10	8	4	3	25	20	6	51
40	20	8	8	3	21	20	12	53
40	30	8	12	3	17	20	18	55
40	40	8	16	3	13	20	24	57
40	50	8	20	3	9	20	30	59
40	60	8	24	3	5	20	36	61
40	70	8	28	3	1	20	42	63
50	10	10	5	3,75	31,25	25	7,5	63,75
50	20	10	10	3,75	26,25	25	15	66,25
50	30	10	15	3,75	21,25	25	22,5	68,75
50	40	10	20	3,75	16,25	25	30	71,25
50	50	10	25	3,75	11,25	25	37,5	73,75
50	60	10	30	3,75	6,25	25	45	76,25
50	70	10	35	3,75	1,25	25	52,5	78,75
60	10	12	6	4,5	37,5	30	9	76,5
60	20	12	12	4,5	31,5	30	18	79,5
60	30	12	18	4,5	25,5	30	27	82,5
60	40	12	24	4,5	19,5	30	36	85,5
60	50	12	30	4,5	13,5	30	45	88,5
60	60	12	36	4,5	7,5	30	54	91,5
60	70	12	42	4,5	1,5	30	63	94,5
Fett 30 % der Trockensubstanz.								
40	10	12	4	3	21	30	6	57
40	20	12	8	3	17	30	12	59
40	30	12	12	3	13	30	18	61
40	40	12	16	3	9	30	24	63
40	50	12	20	3	5	30	30	65
40	60	12	24	3	1	30	36	67
40	70	12	28	3	negativ	30	42	—
50	10	15	5	3,75	26,25	37,5	7,5	71,25
50	20	15	10	3,75	21,25	37,5	15	73,75
50	30	15	15	3,75	16,25	37,5	22,5	76,25
50	40	15	20	3,75	11,25	37,5	30	78,75
50	50	15	25	3,75	6,25	37,5	37,5	81,25
50	60	15	30	3,75	1,25	37,5	45	83,75
50	70	15	35	3,76	negativ	37,5	52,5	—
60	10	18	6	4,5	31,5	45	9	85,5
60	20	18	12	4,5	25,5	45	18	88,5
60	30	18	18	4,5	19,5	45	27	91,5
60	40	18	24	4,5	13,5	45	36	97,5
60	50	18	30	4,5	7,5	45	45	100,5
60	60	18	36	4,5	1,5	45	54	103,5
60	70	18	42	4,5	negativ	45	63	—

Tabelle II (Fortsetzung).

Ökonomischer Koeffizient	1 Eiweiß in %	2 Fett-koeffizient	3 Eiweiß-koeffizient	4 Asche	5 Sonstige organische Bestandteile	6 Kalorischer Wert von Fett	7 Kalorischer Wert von Eiweiß	8 Kalorische Summe 5—7
Fett 40 % der Trockensubstanz.								
30	10	12	3	2,25	12,75	30	4,5	47,25
30	20	12	6	2,25	9,75	30	9	48,75
30	30	12	9	2,25	6,75	30	13,5	50,25
30	40	12	12	2,25	3,75	30	18	51,75
30	50	12	15	2,25	0,75	30	22,5	53,25
30	60	12	18	2,25	negativ	30	27	—
40	10	16	4	3	17	40	6	63
40	20	16	8	3	13	40	12	65
40	30	16	12	3	9	40	18	67
40	40	16	16	3	5	40	24	69
40	50	16	20	3	1	40	30	71
40	60	16	24	3	negativ	40	36	—
50	10	20	5	3,75	21,25	50	7,5	78,75
50	20	20	10	3,75	16,25	50	15	81,25
50	30	20	15	3,75	11,25	50	22,5	83,75
50	40	20	20	3,75	6,25	50	30	86,25
50	50	20	25	3,75	1,25	50	37,5	88,75
50	60	20	30	3,75	negativ	50	45	—
Fett 50 % der Trockensubstanz.								
30	10	15	3	2,25	9,75	37,5	4,5	51,75
30	20	15	6	2,25	6,75	37,5	9	53,25
30	30	15	9	2,25	3,75	37,5	13,5	54,75
30	40	15	12	2,25	0,75	37,5	18	56,25
30	50	15	15	2,25	negativ	37,5	22,5	—
40	10	20	4	3	13	50	6	69
40	20	20	8	3	9	50	12	71
40	30	20	12	3	5	50	18	73
40	40	20	16	3	1	50	24	75
40	50	20	20	3	negativ	50	30	—
50	10	25	5	3,75	16,25	62,5	7,5	86,25
50	20	25	10	3,75	11,25	62,5	15	88,75
50	30	25	15	3,75	6,25	62,5	22,5	91,25
50	40	25	20	3,75	1,25	62,5	30	93,75
50	50	25	25	3,75	negativ	62,5	37,5	—
Fett 60 % der Trockensubstanz.								
30	10	18	3	2,25	6,75	45	4,5	56,25
30	20	18	6	2,25	3,75	45	9	57,75
30	30	18	9	2,25	0,75	45	13,5	59,25
30	40	18	12	2,25	negativ	45	18	—
40	10	24	4	3	9	60	6	75
40	20	24	8	3	5	60	12	77
40	30	24	12	3	1	60	18	79
40	40	24	16	3	negativ	60	24	—
50	10	30	5	3,75	11,25	75	7,5	93,75
50	20	30	10	3,75	6,25	75	15	96,25
50	30	30	15	3,75	1,25	75	22,5	98,75
50	40	30	20	3,75	negativ	75	30	—

ein Rückgang; doch würde auch hier die Berücksichtigung der Zwischenstufen zu einem etwas höheren Wert führen, so daß wir hier einen Fettkoeffizienten im höchsten Falle von etwa 22 als möglich annehmen könnten.

Hierbei muß nun allerdings auch, wie in Tabelle I, die Menge der sonstigen organischen Zellbestandteile berücksichtigt werden. Für 60 % Fett und den ökonomischen Koeffizienten 30 würden diese Bestandteile 22,5, 12,5 und 2,5 %[1] der Trockensubstanz für die Werte von 10 bzw. 20 bzw. 30 % Eiweiß ausmachen. Der letztgenannte Wert (2,5 %) dürfte unmöglich sein, aber auch der zweite (12,5 %) ist zu niedrig, der erste (22,5 %) ebenfalls noch sehr niedrig. Man kann also mit Recht daran zweifeln, ob bei 60 % Fett ein Fettkoeffizient von 20 oder gar noch etwas darüber möglich ist. Für 50 % Fett, ökonomischen Koeffizienten 40 und 10 % Eiweiß würden die sonstigen Zellbestandteile 32,5 % der Trockensubstanz ausmachen, was man für möglich halten kann. Unter allen Umständen aber würde, wie man sieht und wie zu erwarten war, ein hoher, den Wert 15 stark übersteigender Fettkoeffizient nur bei sehr vermindertem Eiweißgehalt möglich sein. Man wird aber mit Recht bezweifeln können, daß der Eiweißgehalt etwa auf 10 % sinken kann, so daß die Möglichkeiten hoher (absoluter) Fettausbeuten, also eines hohen Fettkoeffizienten weiter eingeengt erscheinen.

Man könnte einwenden, daß diese Überlegungen lediglich für die Bildung von (schnell gebildetem) „Reservefett" gültig sein könnten, nicht aber für die spätere Bildung von „Degenerationsfett", zu dem auch ein Eiweißabbau herangezogen werden könnte, so daß sich ein niedriger Eiweißgehalt bei steigendem Fettgehalt ergäbe, ähnlich den für Tabelle II soeben betrachteten Verhältnissen. Das folgende Beispiel

1			2	3	4	5	6	7	8
Ökonomischer Koeffizient	Fett	Eiweiß	Fettkoeffizient	Eiweißkoeffizient	Asche	Sonstige organische Bestandteile	Kalorischer Wert von Fett	Kalorischer Wert von Eiweiß	Summe 5—7
	% der Trockensubstanz								
60	—	70	—	42	4,5	13,5	—	63	76,5
60	42,0	—	25,2	—	4,5	13,5 (22,5 %)	63	—	76,5

zeigt, welches Bild wir unter dieser Annahme erhalten. Dabei ist ein ökonomischer Koeffizient von 60 und ein Eiweißgehalt von 70 % angenommen, und es ist berechnet, wieviel Fett daraus, unter rein energeti-

[1] Diese (relativen) Zahlen wechseln in Tabelle II von Fall zu Fall mit wechselnden Eiweißprozenten und sind deshalb dort nicht jedesmal angegeben, während sie in Tabelle I bei konstanten Eiweiß- und Fettprozenten innerhalb der verschiedenen ökonomischen Koeffizienten *relativ* gleich sind.

schen Voraussetzungen (also ohne Rücksicht auf eine biologische Möglichkeit) sekundär entstehen könnte. Es würde sich also ein Fettkoeffizient von 25,2 ergeben, bei 13,5 sonstigen Zellbestandteilen, was einem %igen Gehalt von 22,5 % entsprechen würde, eine Zahl, die ziemlich niedrig liegt, aber als realisierbar angenommen werden mag. Die kalorische Summe beträgt dann 76,5, ist also zu hoch. Dadurch würde sich der Fettkoeffizient entsprechend erniedrigen müssen, wenn wir die oben angenommene Grenze von 70 zugrunde legen (30 für Betriebsstoffwechsel). Diese Zahl ist 2,6. Weiterhin kann man wohl annehmen, daß nicht *alles* Eiweiß in Fett umgewandelt werden kann. Nehmen wir an, daß nur 10 % statt der ursprünglichen 70 % noch übrig wären, so würde sich der Fettkoeffizient weiter entsprechend, also um 25,2 /7 = 3,6 erniedrigen. Beide Zahlen ergeben somit zusammen 6,2, der Fettkoeffizient wäre also von 25,2 auf 19 gesunken. Berücksichtigt man weiter, daß wir mit einem jedenfalls für Pilze sehr hohen Eiweißgehalt gerechnet haben, ferner, daß kaum so große Mengen von Eiweiß energetisch-quantitativ in Fett umgewandelt werden könnten, so sehen wir, daß auch bei der Annahme von Degenerationsfett der Fettkoeffizient sicherlich unter 20 liegen muß. Auch auf Kosten der sonstigen Zellbestandteile können sich kaum wesentliche Mengen von Fett bilden, da diese sowieso schon sehr niedrig liegen (22,5 %). Würden wir aber anstatt Eiweiß mit großen Mengen sonstiger organischer Zellbestandteile rechnen, so würden wir auch kein günstigeres Bild erhalten, da diese dem Eiweiß gegenüber energetisch minderwertig sind[1]. Wir würden also zu noch geringeren Zahlen des Fettkoeffizienten kommen.

Wie aus Tabelle I können wir also auch aus Tabelle II schließen, daß ein Fettkoeffizient, der den Wert 15 wesentlich übersteigt, kaum möglich erscheint. Es ist durchaus fraglich, ob man den Organismus an dieser Grenze zu einer höheren absoluten Fettleistung zwingen kann. Zwar sind, wie auch Versuche zeigen, hohe *relative* Fettgehalte (Prozentgehalt an Fett) möglich. Aber ein Blick in die beiden Tabellen, namentlich die Tabelle I zeigt, daß ein solcher durch einen niedrigen ökonomischen Koeffizienten erkauft werden muß, wodurch die absolute Ausbeute sinkt. Und weiterhin ist das notwendige Sinken der Eiweißprozente, falls hohe Fettzahlen erzielt werden sollen, der zweite die absolute Fettausbeute begrenzende Faktor, wie oben ausgeführt wurde, der dritte endlich das Sinken der sonstigen organischen Zellbestandteile.

Damit keine Mißverständnisse entstehen, sei noch auf folgendes hingewiesen: In Tabelle I erhielten wir für 20 % Fett und den ökonomischen Koeffizienten 50 (welcher Fall nur als Beispiel für jeden einzelnen herausgegriffen sei) die kalorische Summe 68.75. Da wir aber einen

---

[1] Die Verbrennungswärme von Mannit gegenüber Glucose ist 1,07.

ökonomischen Koeffizienten von 50 angenommen haben, mithin der Rest zu 100 Zucker = 50 veratmet sein muß, so erhielten wir als Gesamtsumme des kalorischen Effektes 68,75 + 50 = 118,75. Das ist an sich natürlich nicht möglich, da wir mit 100 Zucker ja nur zu dem kalorischen Wert 100 kommen können. Das bedeutet indessen nichts anderes, als daß der den Wert 100 übersteigende Teil eben energetisch in die Fettbildung (oder in einen anderen endotherm verlaufenden synthetischen Vorgang) eingegangen sein müßte. Das kann natürlich auch noch für einen gewissen Teil der unter 100 liegenden Kalorien der Fall sein. Diese Größe läßt sich bei unseren Berechnungen naturgemäß nicht bestimmen, sondern nur durch das Experiment ermitteln. Unsere Überlegung dürfte jedenfalls in gleicher Richtung liegen wie die Vorstellung von *Tamiya*, daß die bei endgültiger Energiebilanz der Biosynthese als Wärme abgegebene Atmungsenergie keineswegs ein nutzloser Verlust sei, sondern in der Hauptsache als ein notwendiger Faktor für die Biosynthese überhaupt ihre wichtige Aufgabe zu erfüllen habe (S. 304).

Aus den Tabellen I und II läßt sich weiterhin noch eine praktisch bedeutsame Folgerung ziehen: Wenn man einen Fettkoeffizienten von maximal 15 (oder wenig darüber) erzielen kann, so ist es offenbar von geringerer Bedeutung, wie hoch der prozentige Fettgehalt der Mikroorganismen ist. Er kann nach Tabelle I ebenso gut bei 25 % Fett (wie sich durch Überschlagsrechnung zwischen den Werten bei 20 und 30 % Fett ergibt) erzielt werden wie bei 50 % Fett. Da jedoch im Falle der hohen Fettprozente diese durch geringeren ökonomischen Koeffizienten oder geringeren Eiweißgehalt erkauft werden müssen, so würde sich der durch 25 % Fett erzielte Fettkoeffizient praktisch sogar günstiger stellen als der durch 50 % Fett erzielte, da mehr Mikroorganismensubstanz und mehr Eiweiß anfällt.

Es bleibt nun noch übrig, unsere Berechnungen mit einigen Literaturangaben zu vergleichen, die allerdings erst sehr spärlich vorliegen. Aber es war gerade die Absicht meiner Ausführungen, auf die behandelten Dinge aufmerksam zu machen und die genauere Untersuchung experimentell zu ermittelnder Ergebnisse anzuregen.

Unsere Feststellung, daß ein hoher Fettkoeffizient nur bei niedrigem Eiweißgehalt erzielt werden kann, findet ihre Bestätigung in Beobachtungen von *Prill*, *Wenck* und *Peterson* sowie von *Steiner* und von *Heide*, die deutlich zeigen, wie die Fettausbeuten steigen mit Verminderung der Stickstoffversorgung bzw. des Stickstoffgehalts, also mit Verminderung der Eiweißbildung. In gleicher Richtung wirkt nach *Steiner* und nach *Heide* Verminderung der Versorgung mit Schwefel, und nach *Bichovskaja* bedingt Überschuß an Phosphorsäure ebenfalls eine Verminderung der Fettbildung. Die Versuche von *Heide* zeigen

weiterhin, daß sich auch der ökonomische Koeffizient mit steigender Fettbildung vermindert, wie aus den Zahlen der Tabelle III hervorgeht, die auch den noch stärker gegensinnigen Verlauf der Eiweißbildung mit steigender Fettbildung zeigen.

Die Zahlen von *Heide* (Tabelle VI, S. 153) sind noch der gleichen Berechnung unterzogen wie in Tabelle I und II, wobei allerdings, da

Tabelle III.

1			2	3	4	5	6	7	8
Ökonomischer Koeffizient	Fett	Eiweiß	Fettkoeffizient	Eiweißkoeffizient	Asche	Sonstige organische Bestandteile	Kalorischer Wert von Fett	Kalorischer Wert von Eiweiß	Kalorische Summe 5—7
	in % der Trockensubstanz								
28,9	6,45	53,8	1,9	15,5	2,2	9,3 (32,2 %)	4,75	23,25	37,3
28,1	25,2	27,5	7,1	7,7	2,1	11,2 (39,2 %)	17,75	11,55	40,5
28,1	38,3	13,8	10.8	3,9	2,1	11,3 (40,2 %)	27,0	5,85	44,15
18,2	41,8	10,6	7,6	1,9	1,4	7,3 (40,1 %)	19,0	2,85	29,15
14,6	32,3	9,4	4,7	1,4	1,1	7,4 (51,1 %)	11,75	2,1	21,25

Bestimmungen des Stickstoffgehalts fehlen, die gebotenen Mengen von Stickstoff eingesetzt und als Eiweiß in Rechnung gesetzt wurden (Tabelle III). Sie zeigen, daß die Fettkoeffizienten erheblich niedriger liegen als man nach den prozentigen Fettzahlen nach Tabelle I erwarten sollte. Der Grund liegt in den sehr niedrigen ökonomischen Koeffizienten bei den Versuchen von *Heide*. Da der Zuckerverbrauch bei diesen Versuchen nicht bestimmt wurde, so konnte nur die ganze ursprünglich gegebene Menge als verbraucht angenommen werden. Sollte dies jedoch nicht der Fall gewesen sein, so würde sich der Fettkoeffizient natürlich erhöhen. Allerdings war nach Angabe von Herrn *Steiner* der Zucker verbraucht, so daß der niedrige ökonomische Koeffizient doch Tatsache zu sein scheint. Auch der Eiweißgehalt ist z. T. außerordentlich niedrig, während die Menge der sonstigen organischen Zellbestandteile den Berechnungen der Tabelle I gegenüber recht hoch ist. Aus allen diesen Erscheinungen ergibt sich in Tabelle III eine sehr niedrige kalorische Summe in Spalte 8.

In Tabelle IV sind weiterhin die Berechnungen einiger weiterer Literaturbeispiele durchgeführt. In diesen Beispielen ist allerdings entweder der Stickstoff nicht bestimmt, so daß in diesen Fällen 30 %

Eiweiß angenommen wurden, oder es fehlt die genaue Kenntnis der Kohlenstoffquelle, da die Versuche überwiegend mit Molke vorgenommen wurden, in der, auch bei Bestimmung von Lactose und Milchsäure, noch andere verwertbare Kohlenstoffquellen vorhanden sind. Infolgedessen sind aus dem letztgenannten Grunde die obigen Zahlen für den Fettkoeffizienten etwas zu hoch, was sich offenbar auch in der hohen kalorischen Summe der Spalte 8 ausdrückt.

Tabelle IV.

1			2	3	4	5	6	7	8
Ökonomischer Koeffizient	Fett	Eiweiß	Fettkoeffizient	Eiweißkoeffizient	Asche	Sonstige organische Bestandteile	Kalorischer Wert von Fett	Kalorischer Wert von Eiweiß	Kalorische Summe 5—7
	in % der Trockensubstanz								
45,6	7,5	33,75	3,4	15,3	3,4	23,5 (51,5 %)	8,5	23,0	55,0
54,5	13,4	30	7,3	16,4	4,1	26,7 (47,1 %)	18,3	24,5	69,5
64,4	22,0	17,3	14,2	11,1	4,8	34,3 (53,3 %)	35,5	16,7	86,4
41,4	33,9	30	13,9	12,4	3,1	12,0 (29,0 %)	34,8	18,6	65,4
28,2	45,6	30	12,8	8,5	2,1	4,6 (16,3 %)	32,1	12,8	49,5
28,0	45,7	30	12,8	8,4	2,1	4,7 (16,8 %)	32,1	12,6	49,4

Wo nicht anders angegeben, sind 30 % Eiweiß angenommen.

1) *Fink-Haeseler-Schmidt* (*Oospora*), Tabelle VII, 2 Tage*. — 2) *Heide* (*Endomyces*), S. 161, Tabelle IX, Nr. 2 + viel Asparagin. — 3) Wie 1), 7 Tage*. — 4) *Fink-Haehn-Hoerburger* (*Endomyces*), S. 17, oben, Nr. 5. — 5) *Geffers* (*Oospora*), S. 82, Tabelle VII, 75 Tage**. — 6) Wie 4), S. 16, c.

* 3,6 % Lactose + 0,56 % Milchsäure = 4,16 % Zucker angenommen.
** 4,0 % Lactose angenommen.

Im übrigen bestätigen die Versuche das Ergebnis unserer in Tabelle I und II durchgeführten Berechnungen: Mit hohem prozentigen Fettgehalt steigt der Fettkoeffizient keineswegs, sondern hält sich von 20 bis 45 % Fett auf dem Wert 13 bis 14. Für die hohen Fettgehalte sind zweifellos die mit 30 % angenommenen Eiweißzahlen zu hoch. Würde man nur mit der Hälfte (15 % Eiweiß) rechnen, so ergäbe sich im Falle von (5) 9,0 sonstige Zellbestandteile (= 32 %), was gegenüber der niedrigen Zahl von 16,3 % in Tabelle IV sicher richtiger sein dürfte. Wir sehen also auch hier, daß die Menge der sonstigen Zellbestandteile offenbar nicht zu tief sinken kann, welche Erscheinung wir schon oben

als einen der begrenzenden Faktoren für die Fettbildung festgestellt haben. Weiterhin würde sich dann der Wert der Spalte 8 (kalorische Summe) auf 47,5 stellen, also sich nur unwesentlich ändern.

Dagegen würde sich in Tabelle III bei höherem ökonomischen Koeffizienten die Zahlen für die sonstigen organischen Zellbestandteile ebenfalls erhöhen, und zwar ein ökonomischer Koeffizient von 35 angenommen, auf 14,2 (= 40,6 %), und die kalorische Summe würde sich auf 54,9 erhöhen. Rechnet man umgekehrt bei Tabelle IV, 5) mit dem geringeren ökonomischen Koeffizienten 25, (der ja zu hoch gefunden sein mußte wegen der in Molke sonst noch vorhandenen Kohlenstoffquellen), bei 15 % Eiweiß, so ergibt sich eine kalorische Summe von 42,1, die also gegenüber Tabelle IV etwas gesunken ist. Unter Beachtung der tatsächlichen Verhältnisse würde sich also eine Annäherung der kalorischen Summe der Tabellen III und IV ergeben, ebenso in beiden Fällen eine Erhöhung der sonstigen organischen Zellbestandteile, wenn wir hierbei von Einzelfällen absehen und nur die Gesamtlage betrachten. In diesem Sinne sollen auch nur die zuletzt vorgeführten Berechnungen bewertet werden.

Jedenfalls ergibt sich beim Vergleich der beiden Tabellen III und IV (jene vielleicht etwas zu niedrige, diese etwas zu hohe Werte), daß auch im Experiment kein den Wert 15 übersteigender Fettkoeffizient gefunden wurde, welchen Schluß wir auch oben an Hand der Berechnungen der Tabellen I und II gezogen haben. Auch für den dort gezogenen Schluß, daß sinkender ökonomischer Koeffizient, sinkender Eiweißgehalt und Sinken des Gehalts an sonstigen Zellbestandteilen begrenzende Faktoren der Fettbildung darstellen, haben wir in den vorliegenden Versuchen aus der Literatur eine Bestätigung erhalten. Aber es erscheint dringend notwendig, alle diese Verhältnisse im Experiment genau, also unter Berücksichtigung *aller* bei dem Aufbau des Zellkörpers beteiligten Vorgänge, zu erfassen.

Zusammenfassung.

Analog dem *ökonomischen Koeffizienten* (Menge der Trockensubstanz auf 100 verarbeitete Kohlenstoffquelle) und dem *Eiweißkoeffizienten* (Menge des auf 100 verarbeitete Kohlenstoffquelle gebildeten Eiweiß) wird der *Fettkoeffizient* als die auf 100 verarbeitete Kohlenstoffquelle gebildete Menge von Fett definiert.

Es wurden Berechnungen angestellt über die energetischen Verhältnisse bei der Fettbildung durch Mikroorganismen unter variierten ökonomischen Koeffizienten und Eiweißgehalten. Dabei ergab sich, daß ein Fettkoeffizient von 15 ungefähr das Maximum dessen darstellt, was möglich erscheint. Als begrenzende Faktoren wirken dabei

sinkender ökonomischer Koeffizient, sinkender Eiweißgehalt und Sinken des Gehalts an sonstigen organischen Zellbestandteilen. In der Literatur vorliegende Versuche bestätigen diese Feststellungen. Aus ihnen geht aber hervor, wie wünschenswert eine genaue experimentelle Durcharbeitung der besprochenen Verhältnisse erscheint.

Dieser maximale Fettkoeffizient ist von der Menge des prozentigen Fettgehalts in der Trockensubstanz unabhängig und kann zwischen 25 und 50 % Fettgehalt gleich sein. Das Sinken des ökonomischen Koeffizienten bei hohem Fettgehalt hat sogar den praktischen Nachteil, daß gegenüber geringerem prozentigen Fettgehalt bei gleichen Fettkoeffizienten weniger Mikroorganismenmasse und damit auch weniger Eiweiß gebildet wird.

Literatur.

Bichkovskaja, A. L., Microbiology (russisch) 8, 1170, 1940 (englische Zusammenfassung S. 1180). — *Fink, H.*, *H. Haehn* und *W. Hoerburger*, Chem.-Ztg. **61**, 689, 723, 744, 1937. — *Fink, H.*, *G. Haeseler* u. *M. Schmidt*, Zeitschr. f. Spiritusind. **60**, 74, 82, 1937. — *Flieg, O.*, Jahrb. wiss. Botanik **61**, 24, 1922. — *Geffers, H.*, diese Zeitschr. 8, 66, 1937. — *Heide, S.*, ebenda **10**, 135, 1939. — *Pellegrini, G.*, ebenda **9**, 545, 1938. — *Prill, E. A.*, *P. R. Wenck* u. *W. H. Peterson*, Biochem. J. **29**, 21, 1935. — *Rippel, A.*, u. *K. Nabel*, diese Zeitschr. **10**, 359, 1939. — *Schmidt, M.*, Vorratspflege u. Lebensmittelforsch. **1**, 150, 1938. — *Steiner, M.*, Ber. Deutsch. Botan. Ges. **56**, 73, 1938. — *Tamiya, H.*, Acta Phytochimica **6**, 227, 265, 1932; **7**, 27, 1933.

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.)

Die chromatische Substanz bei Actinomyceten.

Von

O. v. Plotho.

Mit 10 Textabbildungen.

(Eingegangen am 18. Juli 1940.)

Trotz der offensichtlichen Vorteile, welche die von *Feulgen* und *Rossenbeck* vor 16 Jahren ausgearbeitete Reaktion auf Kernsubstanz bietet, hat sich ihre Anwendung auf pflanzliche Objekte verhältnismäßig langsam durchgesetzt. Dies mag, abgesehen von anderen Gründen, zum Teil darauf zurückzuführen sein, daß man seit Beginn der Kernchemie die höheren Nucleinsäuren (Tetranucleotide) einteilte in die „tierische" Thymonucleinsäure, die in tierischen Zellkernen, und die „pflanzliche" Hefennucleinsäure, die in pflanzlichen Zellkernen vorkommen sollte. Die letztere liefert aber die für Thymonucleinsäure charakteristische Reaktion nach *Feulgen* nicht, weil ihr Kohlenhydrat, die d-Ribose, keine reaktionsfähige Aldehydgruppe führt. Gestützt wurden die Bedenken der Cytologen gegenüber der Anwendung der *Feulgen*-Reaktion auf pflanzliche Objekte auch dadurch, daß immer wieder von Beobachtungen mit negativem Ergebnis berichtet wurde. So erhielten z. B. *Boas* und *Biechele* bei 138 von 224 namentlich aufgeführten Pflanzen einen negativen Reaktionsausfall, woran aber wohl die unvollkommene Technik schuld war (vgl. unten). Auch *Petter* und — für gewisse Bedingungen — *Milovidov* stellten bei den verschiedensten Vertretern des Pflanzenreichs das Ausbleiben der Nuclealfärbung fest. Da gelang es *Feulgen*, *Behrens* und *Mahdihassan* 1937 zum ersten Male, pflanzliche Zellkerne präparativ zu isolieren, die chemische Konstitution der in ihnen vorkommenden Nucleinsäure zu ermitteln und auf diese Weise die Identität der tierischen und der pflanzlichen Kernsubstanz darzulegen.

Die häufigen Fehlergebnisse können also nicht auf eine verschiedene chemische Zusammensetzung der Nucleinsäuren zurückgeführt werden, sie müssen andere Ursachen haben. Schon *Milovidov* (1936) konnte für eine Reihe von Objekten das Versagen der Färbung aus mangelhafter technischer Handhabung der verschiedenen Reaktionsstufen erklären, und durch die sorgfältigen Untersuchungen von *Geitler* und *Hillary* konnte ferner für die weitaus größte Mehrzahl der untersuchten Pflanzen nachgewiesen werden, daß das Ausbleiben der charakteristischen Färbung entweder hervorgerufen wurde durch ungeeignet ausgewählte Gewebe (Epidermiszellen), ungenügende Einwirkung der Hydrolyse

(Hydrolysendauer 2 bis 3 Minuten), schädigende Beeinflussung durch das angewendete Fixierungsmittel (besonders bei Vorhandensein von Gerbstoffen), oder endlich verursacht war durch Übersehen der reagierenden Gebilde, die vielleicht wegen ihrer Kleinheit nicht erkannt wurden (chromozentrenartige Gebilde bei *Spirogyra*). Durch diese Untersuchungen ist heute die Zuverlässigkeit der Reaktion kaum mehr bezweifelbar, jedenfalls ist sie bei ernst zu nehmenden Untersuchungen ganz unentbehrlich.

Allerdings ist bei der *Feulgen*-Reaktion der Schluß auf Thymonucleinsäure nur dann zwingend, wenn ihr positiver Ausfall an einem morphologisch und physiologisch als Kern charakterisierten Gebilde eintritt, denn im Kern gibt allen Erfahrungen zufolge nur die nucleinsäurehaltige Komponente der Chromosomensubstanz eine positive Reaktion. Ist aber die nuclealpositive Substanz nicht in Chromosomen oder ihren im Ruhekern auftretenden Vorstufen lokalisiert, sondern findet sie sich in feinster, unter der Grenze der Sichtbarkeit bleibender, Verteilung im Cytoplasma, so daß dieses als ganzes positiv reagiert, so kann wohl, wie das bei Bakterienuntersuchungen immer wieder hervorgehoben wird (*Schussnig*), nicht ohne weiteres auf Thymonucleinsäure geschlossen werden. Erst kürzlich betonte wieder *Schaede* (1939), daß der positive Ausfall der Nuclealreaktion nur den Nachweis „für das „Vorhandensein von echten Aldehyden" erbringt. Er gibt keinen Aufschluß über die stickstoffhaltigen Bausteine und die Konstitution der betreffenden reagierenden Substanz. Bei der großen Anzahl der in der Zelle vorhandenen organischen Verbindungen ist daher die Möglichkeit gegeben, daß bei der Hydrolyse sich aus der einen oder anderen dieser Verbindungen irgendwelche Gruppen abspalten, und daß dadurch etwa freigelegte Aldehyde dann eine Nuclealreaktion vortäuschen können. Möglicherweise könnten sich auch direkt Aldehydgruppen abspalten, die aber strukturgebunden bleiben müßten. Ist also kein eindeutig charakterisierter Kern vorhanden, so muß durch Wechseln der Untersuchungsmethoden, z. B. Anwendung verschiedener Fixierungsmittel, Darbietung extremer Lebensbedingungen, Vergleich der reagierenden Substanz bei verschiedenen Färbemethoden und ähnliches, der Nachweis erbracht werden, daß die fragliche Substanz der nucleinsäurehaltigen Komponente der Chromosomensubstanz, dem Karyotin der botanischen Autoren, zum mindesten als sehr nahestehend angenommen werden muß. Das gilt auch für *Actinomyceten*, deren Untersuchung die vorliegende Arbeit dient.

Material und Untersuchungsmethoden.

Charakteristik der untersuchten Organismen.

Für die Bearbeitung schien es wünschenswert, Vertreter der Gattung mit möglichst verschiedenen Eigenschaften und von unterschiedlicher

Herkunft zu untersuchen. Es wurden daher sowohl freilebende, aus den verschiedensten Medien stammende, als auch symbiontische *Actinomyceten* herangezogen, die zum Teil selbst isoliert waren, zum Teil aus Reinkulturen stammten, die im hiesigen Institut gezüchtet wurden. Stamm *A* und *B* sind die von mir bereits beschriebenen Stämme 6 und 7.

Stamm A: Isoliert aus Waldboden. Sporen grau, kugelig. Bei ihrer Bildung entstehen in den sporogenen Fäden Querwände. Ausscheidung eines dunkelgrauen Farbstoffs. Vierhyphensporen vorhanden.

Stamm B: Isoliert aus Waldboden. Sporen grauweiß, kugelig, bei ihrer Entstehung Querwandbildung. Scheidet einen in alkalischer Lösung violetten, in saurem Medium gelben Farbstoff aus.

Stamm C: Isoliert aus Waldboden. Sporen gelblich, kugelig, bei ihrer Bildung entstehen keine Querwände. Ausscheidung eines gelben Farbstoffs.

Stamm D: Isoliert aus Heideboden. Sporen weiß, kugelig-oval. Bildung wie bei *Stamm C*. Keine Farbstoffausscheidung.

Stamm G: Isoliert aus Waldboden, Sporen grauweiß, rundlich, Bildung wie bei *Stamm C*. Keine Farbstoffausscheidung.

Stamm St: Isoliert von Stroh. Sporen weiß, zylindrisch, Bildung wie bei *Stamm C*. Keine Farbstoffausscheidung.

Stamm Sm: Isoliert aus alter Sauermilch. Sporen weißlich, rund bis oval, Sporenmembran sehr ungleichmäßig verdickt. Bildung der Sporen wie bei *Stamm C*. Keine Farbstoffausscheidung.

Stamm M: Isoliert aus Milch, Sporen weiß, rund, Bildung wie bei *Stamm C*. Keine Farbstoffausscheidung.

Stamm J: Isoliert aus Wurzelknöllchen von *Alnus incana*. Bildete nach der Isolierung während vieler Generationen keine Sporen, später traten diese ohne erkennbare Veränderung der Außenbedingungen spontan auf, und die Eigenschaft der Sporenbildung blieb bei den aus Sporen hervorgegangenen Kolonien konstant. Während der ganzen Untersuchungszeit konnte der sporenlose und der sporulierende Zweig nebeneinander gezüchtet werden. Der sporenlose Sektor enthält in der Membran reichlich Fett- und Wachsstoffe. Sporen weiß, oval, Bildung wie bei *Stamm C*. Keine Farbstoffausscheidung.

Stamm My: Isoliert aus Wurzelknöllchen von *Myrica Gale*. Die ersten Generationen sporenlos, dann Auftreten der Sporenbildung und Weiterentwicklung wie bei *Stamm J*. Sporenloser und sporenbildender Sektor nebeneinander gezüchtet. Sporen weißgrün, kugelig-oval. Bildung wie bei *Stamm C*. Keine Farbstoffausscheidung.

Die Kultur der Stämme erfolgte in der Regel auf Dextrose oder Glycerinnährböden [1], auf denen alle Stämme gut gediehen, doch wurden für bestimmte Zwecke auch andere Nährsubstrate verwendet, deren Zusammensetzung im folgenden besonders angegeben ist.

Die Fixierungsmethoden.

Zur Fixierung wurden Flüssigkeiten verwendet, die vier verschiedene Typen von Fixierungsmitteln repräsentieren. Eine Verhinderung der Reaktion durch die gewählten Typen war nicht zu erwarten, denn durch systematische Untersuchungen (*Bauer*) wurde erwiesen, daß neben der von

[1] Pepton-*Witte* 1,2%, *Liebigs* Fleischextrakt 0,8%, Dextrose 1% bzw. Glycerin 2%, NaCl 0,2%.

Feulgen zunächst vertretenen Beschränkung auf Sublimat-Fixage diese Fixierungsmittel ebenso gute, zum Teil bessere Ergebnisse brachten. Die verwendeten Fixierungsmittel waren: Sublimat-Eisessig 100 : 5; Sublimat-Alkohol nach *Schaudinn*; Fixierungsflüssigkeit nach *Carnoy* (Eisessig-Alkohol-Chloroform); Fixierungsflüssigkeit nach *Juel* (Eisessig-Alkohol, Zinkchlorid); *Flemming-Benda*sches Gemisch (Chromsäure-Osmiumsäure-Eisessig), Osmiumsäuredämpfe.

In diesen Fixierungsmitteln (abgesehen von dem letzten) blieben die Präparate in der Regel 30 Minuten, doch wurden sie zu Vergleichszwecken auch bis zu 24 Stunden in ihnen belassen. In den meisten Fällen wurde die Fixierung mit Sublimat-Alkohol oder mit Sublimat-Eisessig vorgenommen, aber auch mit der Fixierung durch die nicht sublimathaltigen Gemische nach *Carnoy* und *Juel* konnten gute Ergebnisse erzielt werden, ausgenommen an den Kernen des Knöllchengewebes von *Alnus incana* und *Myrica Gale*, die nach *Juel* fixiert, auch nach sechsstündigem Verweilen in der fuchsinschwefligen Säure höchstens eine schwachgelbe Tönung aufwiesen. Besser bewährte sich hier die Fixierung mit Sublimat-Eisessig. Ein sehr gutes Fixierungsgemisch stellt weiterhin das *Flemming-Benda*sche dar (15 ccm 1 %ige Chromsäure, 4,0 ccm 1 %ige Osmiumsäure, 3 Tropfen Eisessig). Die Intensität der Nuclealfärbung steht mit ihm bei Fixierungszeit von 30 Minuten hinter der mit den bereits erwähnten Fixierungsmitteln keineswegs zurück. Es repräsentiert die Gruppe von Fixierungsmitteln, die chemisch Oxydationsmittel sind und seine Wirkung ist daher wegen des Aldehydcharakters des bei der Nuclealreaktion wirksamen Prinzips besonders interessant. Eine Schädigung der Nuclealkörper (Zerstörung der Aldehydgruppe) schien nicht ausgeschlossen, obgleich während der Fixierung die Aldehydgruppen ja noch nicht freiliegen. Sie konnte aber bei normaler Fixierungszeit nicht festgestellt werden, so daß Bedenken gegenüber Fixierungsmitteln, die oxydierend wirken, solange jedenfalls nicht bestehen dürften, als die oxydierenden Substanzen in *den* Konzentrationen vorliegen, wie sie für Fixierungsmittel üblich sind. Eine Eigenschaft, die dem *Benda*schen Gemisch sogar eine Vorzugsstellung vor den anderen einräumt, wird sogleich besprochen werden. Wurden die Präparate aber über die übliche Fixierungszeit hinaus, bis zu 24 Stunden, im *Benda*-Gemisch belassen, so zeigten nach der *Feulgen*-Färbung Mycel und Sporen zwar äußerlich auch noch keinerlei Verquellung oder Schrumpfung, in Fäden und Teilstücken war jedoch keine Nuclealfärbung mehr festzustellen und nur in reifen Sporen fand sich noch ein schwach violett gefärbter Bezirk. Es ist anzunehmen, daß bei der langen Fixierungszeit die Nuclealstoffe durch die Einwirkung der Säuren teilweise aufgelöst wurden.

Nach der Fixierung mit Osmiumsäuredämpfen ($1^1/_2$ Minuten, 1 %ige Osmiumsäure) traten merkwürdigerweise die bei einzelnen Stämmen während der Sporenbildung entstehenden Querwände besonders deutlich hervor. Die Reaktion an den übrigen Bestandteilen war nie sehr intensiv. Möglicherweise wird der reagierende Stoff durch die Einwirkung der Osmiumsäuredämpfe teilweise zerstört. *Hillary*, der eine Reihe von *Algen*, verschiedene niedere und höhere *Pilze*, *Gymnospermen* und *Angiospermen* auf Kernsubstanz untersuchte, empfiehlt nach Fixierung mit Osmiumsäure vor der Hydrolyse ein gründliches Auswaschen der Präparate mit Wasserstoffsuperoxyd. Mit diesem Mittel konnten jedoch bei den hier vorliegenden Objekten keine besseren Ergebnisse erzielt werden. Vielleicht ist dies begründet in der Empfindlichkeit des Materials, denn nach kurzer Waschzeit

trat keine Vertiefung der Farbreaktion ein, nach längerem Auswaschen aber zeigten die plasmatischen Bestandteile der Mycelien Verquellungen, so daß die Ergebnisse der Nuclealreaktion nicht mehr als zuverlässig angesprochen werden konnten.

Es sei hier gleich bemerkt, daß bei allen angewandten Fixierungstypen das gleiche Zellbild entstand, so daß also eine bestimmte Fixage für seine Entstehung nicht verantwortlich gemacht werden kann.

Hydrolysendauer und Temperatur.

Über die Dauer der Hydrolyse liegen zahlreiche Mitteilungen vor (*Milovidov*, Bibliographie der Nucleal- und Plasmalreaktion). Nach manchen erscheint sie als der kritischste Punkt der ganzen Reaktion. Im allgemeinen geht aber aus den meisten Untersuchungen hervor, daß bei höheren Pflanzen und der Mehrzahl der niederen eine durchweg befriedigende Nuclealfärbung nach 5 Minuten Hydrolysendauer bei 60° C in Normalsalzsäure unabhängig vom Fixierungsmittel erreicht werden kann. Das Optimum der Färbung aber wechselt für die verschiedenen Fixierungsmittel mit der Hydrolysendauer. Auch die Temperatur der Säure spielt eine Rolle, worauf weiter unten eingegangen wird. Ebenso kann die Wasserstoffionenkonzentration von Einfluß sein, doch wurden hierzu keine Versuche angestellt. Die im folgenden angegebenen Daten beziehen sich alle auf Normalsalzsäure.

Bei *Stamm A*, der von allen untersuchten die kräftigste Nuclealreaktion zeigte, wurde nach $^1/_2$stündiger Fixierung in Sublimat-Alkohol oder Sublimat-Eisessig eine allerdings noch schwache Färbung (nach Behandlung mit fuchsinschwefliger Säure) sichtbar, wenn die Präparate $^1/_2$ Minute bei 60° hydrolysiert worden waren. Nach Hydrolyse von 2 Minuten war die Färbung schon recht kräftig, sie vertiefte sich aber noch nach Einwirkung der Säure bis zu 4 Minuten und blieb dann diesem Vergleichspräparat gegenüber etwa gleich stark bis zu einer Hydrolysendauer von 10 Minuten. Bei noch längerer Säureeinwirkung konnte ein Abklingen des Farbtons festgestellt werden, und nach einer Hydrolysendauer von 25 Minuten blieb die Farbreaktion aus. *Bauer* spricht der Wirkung des Sublimats das rasche Auftreten und Verschwinden der Färbbarkeit zu, „was mit einer weniger festen Fällung der Zellstrukturen erklärt werden kann“ (*Bauer*, S. 232). Einen ganz ähnlichen Verlauf nahm die Färbbarkeit in Abhängigkeit von der Hydrolysendauer, wenn die Fixierungsmittel nach *Juel* und *Carnoy* verwendet wurden. Wurde aber die Fixierung mit dem *Flemming-Benda*schen Gemisch vorgenommen, so trat das Optimum der Färbung etwas später, etwa nach 5 Minuten ein, und bei einer Hydrolysendauer von 20 Minuten war noch sehr kräftige Anfärbung vorhanden. Auch nach 35 Minuten langem Hydrolysieren war die Färbung noch intensiv. Durch die Fixierung wird

also der reagierenden Nuclealsubstanz eine relative Unzugänglichkeit gegenüber der Hydrolyse verliehen, die sich äußert in der Hinauszögerung der Maximalfärbung und der langen Erhaltung der Färbbarkeit. *Bauer* führt diese Unzugänglichkeit zurück auf eine besonders dichte Fällung der Kernproteide, die den Grad der Strukturschädigungen durch die Hydrolyse weitgehend herabsetze. Diese Gruppe von Fixierungsmitteln läßt nach ihm die Abspaltung von Puringruppen zu, beeinflußt aber die Chromatinstrukturen derart, daß sie gegen weitere Eingriffe resistent bleiben (*Bauer*, S. 240). Da die lange erhaltene gleichmäßige Färbbarkeitsintensität rein praktisch als ein Vorzug des Chrom-Osmiumsäure-Gemisches bezeichnet werden muß, darf dieses als ein sehr geeignetes Fixierungsmittel angesprochen werden.

Weiterhin schien es wichtig, festzustellen, ob durch Änderung der Hydrolysentemperatur eine Veränderung in der Lokalisation der nuclealpositiven Substanz beobachtet werden konnte. *Stille* glaubt nämlich annehmen zu dürfen, daß es sich bei dem diffusen Auftreten der *Feulgen*-Reaktion um ein Kunstprodukt handeln könne, das durch die verhältnismäßig hohe Hydrolysentemperatur von 60° hervorgerufen würde. Durch Hydrolysieren bei 40° bliebe dagegen die natürliche Lokalisation der Nuclealstoffe besser gewahrt. Es wurden daher mehrere Versuche bei einer Säuretemperatur von 40° durchgeführt. Dabei wurde die Hydrolysendauer ebenfalls geändert. Bei 40° wurde nach Sublimat-Alkoholfixierung eine kräftige Färbung erst nach einstündigem Verweilen in der Säure erreicht. Die gefärbten Präparate zeigten dann in allen Fällen das gleiche Bild wie nach der Hydrolyse von 4 Minuten bei der üblichen Temperatur. Insbesondere konnte nie eine andersartige Verdichtung der nuclealpositiven Substanz in bestimmten Strukturen festgestellt werden. Dagegen zeigten sich in jungen Fäden manchmal Verquellungen, was auf das lange Verweilen in der Säure zurückgeführt werden muß, denn dieses ist, selbst in der sehr verdünnten Salzsäure, sicherlich von Nachteil. Schließlich wurden noch eine Reihe von Präparaten bei einer Temperatur von 80° hydrolysiert. Hierbei trat das Optimum der Färbung schon nach 1 Minute ein. Das Protoplasma war dann nach allen Seiten hin noch scharf begrenzt, so daß die Präparate nie einen „ausgelaufenen“ Eindruck machten. Das cytologische Bild der Zellstrukturen aber war ebenfalls das gleiche wie unter den üblichen Hydrolysebedingungen, so daß also weder die Hydrolysendauer, noch die Temperatur der Säure einen Einfluß auf das Zellbild auszuüben vermochten.

Allgemeine Bemerkungen zur Untersuchungsmethode.

Das Material zur Anfertigung der Nuclealpräparate entstammte Kulturen von flüssigen oder festen Nährböden, es wurde mit der Platinöse auf dem Deckglas verrieben oder in Klatschpräparaten, die durch Auflegen des

Deckglases auf den Agar hergestellt wurden, untersucht. Um ein möglichst ungeschädigtes Bild der Hyphen zu erreichen, wurden außerdem junge Kolonien aus dem Nährboden ausgestochen, 5 Minuten lang in Osmiumsäuredampf fixiert, mehrere Stunden in 50%igen Alkohol gebracht [vgl. *Schaede* (1939)] und dann in üblicher Weise für die Paraffineinbettung vorbereitet. Die 5 μ dicken Schnitte wurden nach der *Feulgen*-Methode behandelt. Sie erwiesen sich jedoch als für die Untersuchung des außerordentlich kleinen Materials nicht geeignet, so daß die geschilderte Methode nicht weiter verwandt wurde.

Das fixierte Material wurde durch die Alkoholreihe geführt und 20 bis 24 Stunden in 96%igem Dimedonalkohol (Dimethylcyclohexandion) belassen zur Verhinderung einer Plasmalogenreaktion und zur Beseitigung etwa vorhandener freier Aldehyde. Eine beobachtete Gelbfärbung der Kerne des Knöllchengewebes von *Alnus incana*, die vielleicht mit der stets etwas gelbstichigen fuchsinschwefligen Säure zusammenhängen konnte, veranlaßte mich, die Säure durch aktive Holzkohle zu filtrieren, so wie das von *Coleman* angegeben worden ist. Die auf die übliche Weise hergestellte, bereits gebleichte Säure wurde durch pulverisierte Lindenkohle (D. A. B. 5) filtriert. Die Lösung wird dann völlig farblos. Es zeigte sich aber, daß die Färbekraft der so behandelten Säure hinter der der unfiltrierten zurückbleibt, und daß sie auch weniger lange haltbar ist, was mit einem geringeren Überschuß an freier schwefliger Säure zusammenhängen dürfte. Diese wird offenbar zum Teil von der Kohle adsorbiert, denn beim Filtrieren nimmt das Filtrat zunächst einen schwach rötlichen Ton an, der allerdings bald verschwindet, aber der Geruch nach SO_2 ist bei der filtrierten Säure immer weniger stark als bei der unfiltrierten. Es wurde daher fast immer die unfiltrierte, genau nach den ursprünglichen Vorschriften hergestellte, Säure benutzt. Um alle Reste der fuchsinschwefligen Säure zu entfernen, wurden die Präparate stets mehrere Stunden in mehrfach gewechseltem SO_2-Wasser belassen. Zum Vergleich wurden immer Kontrollpräparate ohne vorherige Hydrolyse herangezogen; an der Echtheit der Reaktion kann daher kein Zweifel bestehen.

Plasmagegenfärbungen wurden mit 0,6%igem *Becher*schen Alizarinviridin, mit Fuchsin-Jodgrün (0,01% Fuchsin, 0,15% Jodgrün) und mit *Giemsa*-Lösung gemacht. Bei Benutzung eines grünen Farbfilters (1,5 ccm Orange G, 1% wässerig, 4 ccm Methylenblau, $^1/_{00}$ wässerig, 100 ccm aq. dest. Glasküvette von 1 cm innerer Weite) traten die nuclealgefärbten Zellbestandteile erheblich kontrastreicher hervor. Die Untersuchung erfolgte im allgemeinen in Glycerineinbettung, zuweilen in SO_2-Wasser mit Zusatz von Glycerin.

Die Mikrophotographien sind im Hellfeld mit Homal IV, aplanatischem Kondensor 1,4, mit verschieden großer Blendenöffnung aufgenommen. Objektiv: Ölimmersion, Apochromat mit numerischer Apertur 1,3, Eigenvergrößerung 120 : 1.

Ergebnisse.

Für *Actinomyceten* liegen nur wenige Untersuchungen mit der *Feulgen*-Methode vor. *Rippel* und *Witter* stellten diffuse Reaktion fest. *Badian* (1936) beschreibt in fünf mit der Nuclealreaktion untersuchten Actinomycetenstämmen univalente und bivalente Chromosomen, Autogamie, Chromatinreduktion, Chromosomenteilungen. Von all dem konnte ich nichts beobachten. *Schaede* veröffentlichte kürzlich Mitteilungen über freilebende

und symbiontische Actinomyceten, die „ausschließlich diffuse Reaktion des Plasmas in den Fäden, wie in den Sporen und sonstigen Organen“ zeigten.

Von den hier untersuchten Organismen lieferte *Stamm A*, der als erster besprochen werden soll, die kräftigsten Färbungen.

Stamm A. Auf zusagenden Nährböden beginnt bei einer Temperatur von 29° nach etwa 48 Stunden das Mycel sich in vegetative und sporogene Fäden zu sondern. Beide Fadenarten geben in den jüngsten Stadien schwach positive, diffuse Nuclealfärbung. Die sporogenen Fäden sind

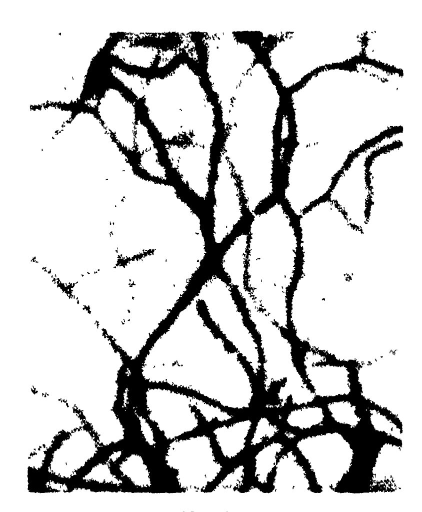


Abb. 1.
Stamm G. Gramfärbung, Vergr. 1 : 1700. Beginnende Plasmakondensierung.



Abb. 2.
Stamm A. Feulgenfärbung + Gegenfärbung mit Fuchsin-Jodgrün, Vergr. 1 : 1500. Fortgeschrittene Plasmakondensierung.

gegenüber den vegetativen stets etwas verbreitert und lassen bei der *Feulgen*-Färbung bald tiefere diffuse Farbtönung erkennen. Am dritten bis vierten Tag nach der Impfung beginnt das gesamte Plasma der sporogenen Fäden innerhalb des Fadens in stäbchenförmige Teilstücke zu zerfallen, die sich kräftiger färben und dadurch die Kondensation des Plasmas andeuten, wie schon *Schaede* (1939) beobachtete. Zwischen den Teilstücken entstehen oft ganz gleichmäßige, oft auch unregelmäßig große Zwischenräume, in denen keine ungefärbte Grundsubstanz zu finden ist. Die dünne verbindende, schwach konturierte Fadenmembran ist aber deutlich am ganzen Fadenverlauf zu verfolgen. Während des weiteren Verlaufs des Wachstums kondensieren sich die stäbchenförmigen Teilstücke weiter und runden sich schließlich zu kugeligen Körpern ab. Sie liegen dann ungleich weit voneinander entfernt, meistens einzeln, teilweise aber auch zu zweien nahe beieinander. Die Membran des Fadens erscheint nicht verdickt. Diese Entwicklung ist an den Abb. 1 und 2 sehr gut zu verfolgen. (Zu Abb. 1: Das Bild des

Plasmazerfalls ist bei *St. A* und allen übrigen Räumen genau das gleiche wie bei *St G*, den die Abbildung wiedergibt.)

Sobald die Kondensation des Plasmas bis zur Entstehung rundlicher Teilkörperchen vorgeschritten ist, beginnen viele Fäden ihrer ganzen Länge nach bei der geringsten Berührung oder auch spontan in stäbchenförmige Abschnitte von ungleicher Länge auseinanderzubrechen. Jedes „Stäbchen" enthält in der Regel ein Plasmakörnchen, das entweder in der Mitte oder an einem Polende liegt. Auf die bei *Stamm A*

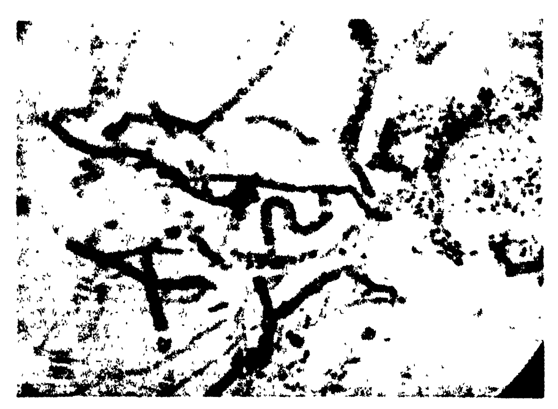


Abb. 3. *Stamm A*. Feulgenfärbung + Gegenfärbung mit Fuchsin-Jodgrün, Vergr. 1 : 1500. Bildung der Segmentationssporen.

vorkommende Ausnahme der Körnchenverteilung wird sogleich einzugehen sein. Die Fadenfragmente bilden so eine einzelne Zelle, eine Art Spore, aus der, auf neues Nährsubstrat gebracht, regelmäßig ein neues Pflänzchen entsteht. Die Bruchstücke sollen daher mit *Lachner-Sandoval* als Fragmentationssporen bezeichnet werden. Die Fragmentationsneigung ist bei den einzelnen Stämmen verschieden groß, *Stamm St*, *Sm* und *M* zeigten sie kaum.

Bei nicht zerbrochenen sporogenen Fäden beginnt beim weiteren Wachstum die Membran sich zu verbreitern. Die Verbreiterung erfolgt vom Fadenende her, so daß man oft Fäden finden kann, deren ungefärbter Membranteil an einem Ende erheblich dicker ist als am anderen. Der gefärbte Inhalt ist aber überall gleich groß. Gleichzeitig setzt in den ältesten Zellteilen Querwandbildung ein. Die Querwände entstehen von der Fadenmembran aus und wachsen in das Innere des Fadens hinein. Auf Abb. 6 und 7 sind sie deutlich erkennbar. Dadurch entstehen im Faden einzelne Segmente, die sich schließlich ablösen und die eigentlichen Sporen des Pilzes, die Luftsporen darstellen. *Lachner-Sandoval* nannte sie schon auf Grund ihrer Entstehung Segmentationssporen, sie sollen auch hier so benannt werden (Abb. 3, 6 u. 7). Die Mikrophotographie der Abb. 3 stellt ein Nuclealpräparat dar, das mit

Fuchsin-Jodgrün gegengefärbt ist. Es fällt sofort auf, daß die Membranen der segmentierten Hyphen und der einzelnen Luftsporen verhältnismäßig stark verdickt sind und einen dunkleren Farbton aufweisen als die vegetativen Fäden. Diese Membranen erscheinen im Präparat bei Gegenfärbung mit Jodgrün gegenüber den farblosen vegetativen und jungen sporogenen Fäden immer von graugrünlichem Ton, was auf eine abweichende chemische oder physikalische Zusammensetzung hindeutet. Auch im Nuclealpräparat ohne Gegenfärbung besitzen die erwähnten Membranen immer einen blaßgrauen Farbton, während die anderen völlig farblos sind. Wir werden hierauf weiter unten zurückkommen.

Die besprochene Art der Sporenbildung findet sich bei *Stamm A* und *B*. Die Segmentationssporen haben zunächst würfelförmige Gestalt, runden sich aber mit zunehmender Reife



Abb. 4.
Stamm A. Feulgenfärbung, Vergr. 1 : 1500.
Reife Sporen.

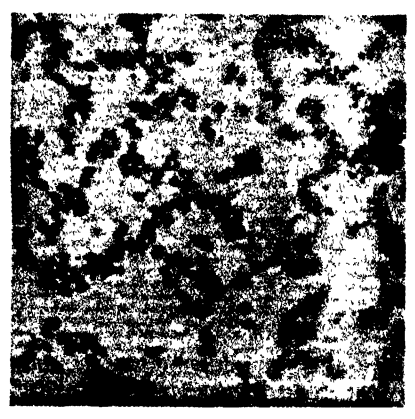


Abb. 5.
Stamm B. Feulgenfärbung, Vergr. 1 : 1500.
Reife Sporen.

bis zur Kugelgestalt ab. Das jetzt tief violett gefärbte Plasmakügelchen im Innern kondensiert sich noch weiter, seine lineare Ausdehnung beträgt in reifen Sporen 0,2 μ, während die ganzen Sporen 0,5 bis 0,6 μ messen, so daß ihre Membran gegenüber der der Fäden relativ dick und stark lichtbrechend erscheint. Die Abb. 4 und 5 stellen reife Sporen dar. Die vegetativen Fäden zeigen, solange sie als solche vorhanden sind, diffuse Nuclealfärbung.

Die Querwandbildung in Verbindung mit der Entstehung der Luftsporen wurde bereits von *Sauvageau* und *Radais* angegeben und ausführlich beschrieben in der Dissertation von *Lachner-Sandoval*, der die Entstehung der Fragmentations- und Segmentationssporen sorgfältig beobachtete. *Lieske* bezeichnete diese Angaben als Beobachtungsfehler und in der neueren Literatur finden sich dann, vielleicht auf die Autorität *Lieskes* hin, keine Angaben mehr über Querwandbildung bei der Sporenentstehung von *Actinomyceten*. Es kann aber gar nicht zweifelhaft sein, daß sie bei ihnen vorkommt. In den übrigen untersuchten Stämmen

verläuft die Abgliederung der Luftsporen durch Einschnürung der Hyphenmembran, so wie *Lieske* sie beschreibt und abbildet und wie sie nach ihm oft, z. B. bei *Lehmann-Neumann* auf S. 768, Bd. II, dargestellt wurde. Es braucht daher hier auf sie nicht weiter eingegangen zu werden.

Es wurde erwähnt, daß die Fragmentationssporen im allgemeinen *ein* nuclealpositives Plasmakörnchen enthalten. Zwischen diesen „normalen" Stäbchenformen finden sich bei *Stamm A* immer andere, stark verdickte Stäbchen, die an den Polenden *je ein* nuclealpositives Körnchen aufweisen. Offenbar sind in sie also 2 Plasmakörnchen eingegangen. Diese verdickten Stäbchen keimen regelmäßig auf dem gleichen Nährboden, auf dem sie entstanden sind, mit einem bis vier Keimschläuchen aus, im Gegensatz zu den normalen Fragmentationssporen, die sich erst auf neuem Nährsubstrat entwickeln. Das Bild der ausgekeimten Sporen gleicht, wie die von mir bereits an anderer Stelle gegebene Abbildung (*v. Plotho*, Abb. 1) zeigt, besonders auch in dem charakteristischen Winkel der Keimschläuche zu dem Mutterstäbchen, genau den von *Lieske* als Vierhyphensporen beschriebenen und abgebildeten Formen. Nach der Auskeimung sind mit der Nuclealreaktion die Polkörperchen nicht mehr nachweisbar, sondern das ganze Stäbchen erscheint diffus gefärbt. Bei den übrigen Stämmen fanden sich diese Formen niemals.

Stamm B. Bei diesem Stamm verlief die Entwicklung genau wie bei *Stamm A*, nur die Vierhyphensporen fanden sich nicht. Die Membranverdickung der Segmentationssporen wurde bei ihm ebenfalls festgestellt, und zwar schien sie bei diesen beiden Stämmen erheblicher zu sein als bei den übrigen, wenn sie diesen auch keineswegs fehlte. Sie hängt zum Teil mit der Hydrolyse zusammen.

Mit der partiellen Hydrolyse ist zweifellos eine Substanzveränderung in der Membran verbunden. Werden nicht hydrolysiertes Mycel und nicht hydrolysierte Sporen mit wässerigem Methylenblau gefärbt, so zeigt gesundes, lebenskräftiges Material eine gleichmäßige, tiefblaue Membranfärbung, so daß Innenstrukturen nicht erkennbar sind. Zuweilen treten allerdings bei sehr stark verdünnten Lösungen tiefer gefärbte Körnchen auf, die als Kerne angesprochen wurden (*Lieske*, S. 82f.), die aber sicherlich Reservestoffe darstellen, denn sie sind mit der Nuclealfärbung nicht nachweisbar. In den weitaus meisten Fällen ist aber keinerlei Differenzierung des Fadeninhalts feststellbar. Werden aber mit Normalsalzsäure bei 60° C 5 Minuten lang behandelte, gut ausgewaschene Präparate mit Methylenblau gefärbt, so ergibt sich, daß die Membran ihre Färbbarkeit verloren hat, sie bleibt ganz ungefärbt. Dagegen erscheinen die Inhaltsbestandteile der Zellen jetzt tiefblau, und zwar zeigen sie im sporogenen Mycel, in Fragmentations- und

Segmentationssporen genau die gleiche Form und Verteilung wie bei der Nuclealfärbung.

Auch die Querwände zwischen den Zellen sind bei den Segmentationssporen deutlich zu erkennen. Die segmentierten Hyphen und die Membran der Segmentationssporen sind jedoch nicht völlig farblos, sondern schwach blaugrün getönt. Das entspricht der bei *Stamm A* erwähnten blaßgrauen Färbung der entsprechenden Zellen im Nuclealpräparat. Die vegetativen Fäden sind gleichmäßig blau gefärbt (Abb. 6 u. 7). Das gleiche Bild entstand mit *Löfflers* Methylenblau und anderen basischen Farbstoffen. Nach Säurebehandlung entspricht also die Färbung durch basische Farb-

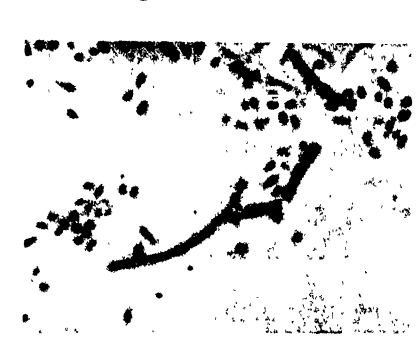


Abb. 6. *Stamm B*. Methylenblaufärbung nach Säurebehandlung, Vergr. 1 : 1700. Querwandbildung bei Segmentationssporen.



Abb. 7. *Stamm B*. Methylenblaufärbung nach Säurebehandlung, Vergr. 1 : 1700. Querwandbildung bei Segmentationssporen.

stoffe im Effekt durchaus einer solchen durch die distinkte „Färbung“ mit fuchsinschwefliger Säure; Basophilie und Nuclealfärbung laufen demnach hier weitgehend parallel.

Ein ähnliches Ergebnis wurde erzielt, wenn die Membranbehandlung mit anderen Säuren gleicher Wasserstoffionenkonzentration vorgenommen wurde, denn die Membranveränderung ist eine Funktion der Wasserstoffionenkonzentration. n/2 Schwefelsäure wirkt ungefähr gleich gut, Essigsäure wirkt wegen ihrer geringen Dissoziationskonstante zu schwach, Oxalsäure besser, denn ihre Dissoziationskonstante ist größer. Oxydierende Säuren, wie Salpetersäure, wurden wegen ihrer Oxydationswirkung nicht herangezogen. Die besten Bilder wurden aber immer mit Normalsalzsäure erzielt. Nach der Behandlung mit allen Säuren war eine stärkere Verdickung der Membranen bemerkbar als bei nicht hydrolysiertem Material, sie erschien besonders auffällig nach Fixierung mit Sublimat-Eisessig. Die stärkere Verdickung darf auf eine geringe Membranquellung zurückgeführt werden als Folge der Einwirkung der warmen Säure. Ob diese Quellung durch die Säureeinwirkung direkt

hervorgerufen wird, oder ob sie erst eintritt bei der Verdünnung der Säure während des Auswaschens der Präparate, konnte nicht festgestellt werden. Auch *Berg* beobachtete — allerdings an tierischem Material — derartige Veränderungen der Zellkonturen.

Im Zusammenhang mit dieser Verdickung und der in den besprochenen Stadien charakteristischen Färbung der Membranen wurden eine Reihe von Versuchen durchgeführt, um ihre chemische Struktur aufzuklären, über die noch sehr wenig bekannt ist. Chitin und Cellulose konnten nie, weder auf makroskopischen noch auf mikroskopischen Nachweis hin in ihnen nachgewiesen werden (*Rippel* und *Witter*, *v. Plotho*).

Um die Reaktion der Membransubstanz möglichst unbeeinflußt vom Cytoplasma zu erhalten, mußte versucht werden, dieses aus den Zellen herauszulösen. Das war mit verdünnter Eau de Javelle-Lösung gar nicht, mit unverdünnter nur unvollständig möglich. Wurde zur Feststellung des Zellinhaltes nach der Behandlung mit Eau de Javelle (nach sorgfältigem Auswaschen) das Material hydrolysiert und mit Methylenblau gefärbt, so zeigte sich immer wieder, daß Fäden und Sporen nicht plasmafrei wurden. Das gleiche Ergebnis hatten Versuche mit wässerigem salicylsaurem Natrium (1 : 1). Ein guter Erfolg wurde jedoch erzielt mit einer mir von Herrn Prof. *Rippel* mitgeteilten Methode. Dazu wurde das Untersuchungsmaterial in Wasser aufgeschwemmt und mit NH_4OH und H_2O_2 (30 %ig) versetzt. Nachdem die Sporen völlig gebleicht waren (die Hyphen aller untersuchten Stämme sind farblos), was unter Umständen mehrere Tage dauerte und mehrmaliges Nachfüllen der Reagentien erforderte, wurde mit HCl neutralisiert und zentrifugiert. Die Struktur der Sporen und Fäden war gut erhalten; im mikroskopischen Bild war bei entsprechender Einstellung in vielen Sporen direkt erkennbar, daß das Plasma verschwunden war. Die Membranen gaben dann bei mikroskopischer Betrachtung mit folgenden Reagentien die angegebenen Reaktionen:

Auf Zusatz von *Löfflers* Methylenblau . .	Membran	schwach blau
„ „ „ Kupferoxydammoniak . .	„	nicht gelöst
„ „ „ Jodkalium	„	hellgelb
„ „ „ Jodschwefelsäure	„	tiefgelb-braun
„ „ „ Chlorzinkjod	„	farblos-schw.-gelbl.
„ „ „ heißer 20 %ig. NaOH . .	„	quillt, später Schrumpfung

Nach dem Ausfall dieser Reaktionen muß angenommen werden, daß die Membranen den Charakter jener Substanzen besitzen, die man als *Hemicellulosen* zusammenfaßt. Interessant ist die Braunfärbung auf Zusatz von Jodschwefelsäure, die bei Verwendung reinen Sporenmaterials besonders bei *Stamm A* auftrat. Sie läßt auf Substanzen schließen, die in die Klasse der polymeren Terpene einzureihen sind,

und die bisher nur in den Membranen der Sporen und Pollen gefunden wurden (*Klein*). Man hat sie daher Sporopollenine genannt. Auf die Ablagerung dieser Stoffe dürfte möglicherweise die oben angegebene abweichende Tönung bei der Nucleal- und Methylenblaufärbung nach Säurebehandlung, sowie die Verdickung in den Membranen der sporulierenden Hyphen und der Sporen selbst zurückgehen. Zur Klärung dieser Frage sind aber genauere Untersuchungen nötig.

Ebenso läßt sich die Frage, in welcher Richtung im chemischen Sinne durch die Säurebehandlung auf die Struktur der Membranen eingewirkt wird, vorläufig nicht beantworten. Die zur Charakterisierung von Hemicellulosen zur Verfügung stehenden Reagentien geben keine geeignete Handhabe für die Feststellung einer chemischen Substanz-

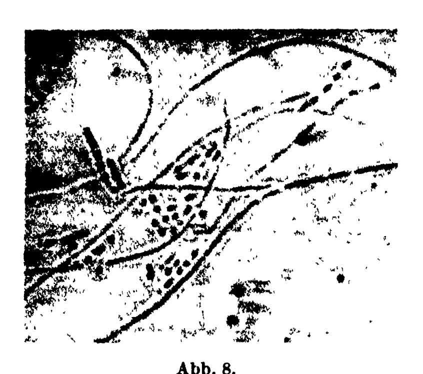


Abb. 8.
Stamm C. Feulgenfärbung, Vergr. 1:1500.
Beginnende Plasmakondensierung.



Abb. 9.
Stamm C. Feulgenfärbung, Vergr. 1:1500.
Fortschreitende Plasmakondensierung.

änderung in bestimmtem Sinne. Immerhin darf an eine teilweise Lösung durch die Einwirkung der warmen Säuren gedacht werden, denn Hemicellulosen hydrolysieren leicht und werden nach längerem Kochen in verdünnten Säuren, z. B. 5%iger Schwefelsäure, sogar vollständig gelöst. Diese teilweise Lösung drückt sich in einer geringen Quellung aus, von der oben berichtet wurde. Diese Quellung und die später zu besprechenden Einlagerungen in die Membran machen die Verbreiterung der Sporen und sporulierenden Hyphen so auffällig.

Stamm C. Die Abb. 8 und 9 stellen sehr schön die beginnende und fortschreitende Teilung und Kondensation des Plasmas in den sporogenen Fäden dar. Da die Aufnahmen die Nuclealfärbung ohne Gegenfärbung zeigen, läßt sich auch einwandfrei die Vertiefung des Farbtons bei zunehmender Plasmakondensierung erkennen. Auch der abweichende Typus der Sporenbildung tritt klar zutage, die charakteristischen Querwände bei der Sporenbildung fehlen. Die Kondensation des Plasmas

in den Sporen ist aber ziemlich kräftig, was aus der geringen Größe und dem dunklen Farbton der Plasmakörnchen hervorgeht.

Stamm D. Bei diesem Stamm erscheint die Sporenmembran nicht so stark lichtbrechend wie bei den bisher besprochenen, was auch die Abb. 10 erkennen läßt. Sie ist etwas weniger verdickt. Die Entwicklung verläuft aber auch bei diesem Stamm genau in der gleichen Weise wie bei den übrigen. Das trifft auch für alle anderen untersuchten Stämme zu.

Stamm St und *Stamm Sm*, die von Stroh bzw. von alter Sauermilch isoliert waren, besitzen eine besonders stark und ungleichmäßig verdickte Sporenmembran. Diese Beobachtung veranlaßte mich, die Widerstandsfähigkeit der Sporen und des sporenlosen Mycels gegen Hitze und Austrocknung zu prüfen. Eine Platinöse sporenlosen Mycels bzw. reifer Sporen wurde in einem Reagensglas in $^1/_2$ ccm etwa 40^0 warmen Wassers aufgeschwemmt. Die so beschickten Reagensgläser wurden während der in der Tabelle angegebenen Zeit in ein Wasserbad mit konstanter Temperatur gehalten, schnell abgekühlt und unmittelbar nach der Abkühlung auf Glycerinagar geimpft. Die Ergebnisse gehen aus der Tabelle I hervor.

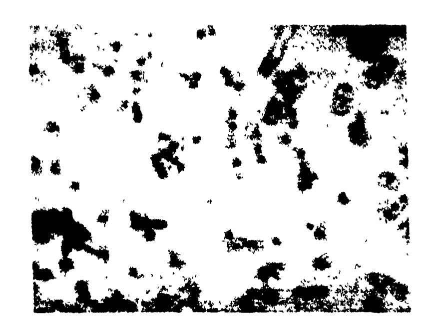


Abb. 10.
Stamm D. Feulgenfärbung, Vergr. 1:1700.
Reife Sporen.

Tabelle I. Prüfung auf Temperaturbeständigkeit.

Stamm	Grad der Erhitzung	*Mycel* Zeit der Erhitzung in Min.		*Sporen* Zeit der Erhitzung in Min.	
		3	5	3	5
A	65	+	—	+	+
A	70	—	—	+	—
A	75	—	—	—	—
D	65	+	—	+	+
D	70	—	—	+	—
D	75	—	—	—	—
M	70	—	—	+	—
M	75	—	—	+	—
M	80	—	—	—	—
St	75	—	—	+	—
St	80	—	—	+	—
St	85	—	—	—	—
Sm	75	—	—	+	+
Sm	80	—	—	+	—
Sm	85	—	—	+	—
Sm	90	—	—	—	—

Aus der Zusammenstellung ist ersichtlich, daß bei allen Stämmen die Luftsporen höhere Wärmegrade ertragen als die übrigen Mycelteile. Die Hyphen gingen alle bei einer 3 Minuten langen Erhitzung auf 70° zugrunde. Die Sporen der im Boden lebenden Stämme hielten die Erhitzung etwas schlechter aus als die der atmosphärischen Luft ausgesetzten. Sporenmaterial der *Stämme St* und *Sm* ertrug Hitzegrade von 80 bzw. 85° C bis zu 3 Minuten. Gegen eine längere und höhere Erhitzung waren aber auch sie nicht gerüstet.

Zur Prüfung der Widerstandsfähigkeit gegen Austrocknung dienten der sporenlose und der sporenbildende Zweig der beiden Stämme *J* und *My*. Es wurde bereits erwähnt, daß es gelang, beide Zweige nebeneinander zu züchten. Der sporenlose mußte aber, um am Leben erhalten zu werden, weit häufiger überimpft werden als der sporenbildende. Über den vom Alter der Kultur abhängigen Impferfolg unterrichtet die Tabelle II. Die Reagensglaskulturen standen bei Zimmertemperatur.

Tabelle II. Widerstandsfähigkeit gegen Austrocknung.

Stamm	Impferfolg bei Alter der Kultur in Tagen			
	10	20	30	40
J versport	+	+	+	+
J unversport	+	+	—	—
My versport	+	+	+	+
My unversport	+	+	—	—

So deuten sowohl die chemischen als auch die mit „mechanischen“ Methoden geführten Untersuchungen darauf hin, daß die *Actinomyceten* ihre Sporenmembranen mit Substanzen ausrüsten, die den Hyphenmembranen fehlen, eine Tatsache, die durch die Ergebnisse der verschiedenen Färbungen schon sehr wahrscheinlich gemacht wurde.

Stamm J. Durch viele Generationen hindurch blieb dieser aus Wurzelknöllchen von *Alnus incana* isolierte Stamm sporenlos, bis die Sporen ohne erkennbare Veränderung der Außenbedingungen spontan auftraten. Der sporenlose und sporenbildende Zweig konnten dann nebeneinander kultiviert werden. Der sporenlose Zweig enthielt neben gleichmäßig diffus gefärbten Fäden nur wenige, in denen eine Teilung des Plasmas in verhältnismäßig lange Teilstücke, aber nie eine Plasmakondensation zu bemerken war. Die Zerlegung des Plasmas in kürzere Teilstücke oder kugelige Formen blieb aus.

Diffuse Färbung und Plasmateilung fanden sich auch in Schnitten durch das Knöllchengewebe. Ebenso waren die Involutionsformen, die bekannten „Bläschen“, diffus gefärbt. Ihr Plasma erschien jedoch nicht homogen, sondern eigentümlich granuliert, was wohl darauf zurückzuführen ist, daß es sich nicht mehr in lebensfähigem Zustande befindet.

Das Karyotin der Kerne des Knöllchengewebes gab bei keiner Fixierungsmethode eine kräftige Reaktion. Das mag mit dem Vorhandensein von Gerbstoffen zusammenhängen, mit denen die Oberflächenzellen der Knöllchen meist dicht gefüllt sind (*Schaede*, 1939).

Der sporenbildende Zweig des Stammes glich in der Sonderung des Mycels nach vegetativen und sporogenen Fäden und in der Teilung und Kondensierung des Plasmas bis zur Luftsporenbildung genau den übrigen Stämmen. Querwandbildung findet nicht statt.

Stamm My. Die Entwicklung des Stammes ähnelt ganz der des vorigen. Der sporenlose und sporenbildende Zweig zeigten die gleichen cytologischen Bilder wie *Stamm J.* Auch die Befunde in den Schnittpräparaten stimmten überein. Es konnte die beginnende Plasmateilung, die bereits von *Schaede* (1939) festgestellt wurde, beobachtet werden. Die Kernsubstanz der Wirtskerne färbte sich sehr oft überhaupt nicht, so daß in der gleichen Zelle ungefärbtes Karyotin und diffus gefärbtes Endophytenmycel nebeneinander lagen. Das mag wieder seine Ursache in dem Tanningehalt der Knöllchen haben, denn auch bei *Myrica* ist er beträchtlich.

Kritische Prüfung der Ergebnisse.

Die etwaige Entstehung des zytologischen Bildes durch nicht aus Karyotin bestehende Stoffe.

Wenn uns die Nuclealreaktion gelehrt hat, daß eine Anzahl von Bildungen, die im Protoplasma auftraten und für Karyotin gehalten wurden, nichts mit diesem zu tun hatten, weil sie ungefärbt blieben, so darf uns das natürlich nicht zu dem Schluß verleiten, daß alle im Protoplasma vorkommenden Partikel, die eine Nuclealfärbung geben, unbedingt aus Karyotin bestehen müssen. Von *Feulgen* selbst ist darauf aufmerksam gemacht worden, daß diffus verteiltes Plasmalogen „eine Substanz von Lipoidcharakter", in tierischen Zellen weitverbreitet, durch Sublimat in Plasmal verwandelt wird, und *ohne* Hydrolyse violette Aldehydreaktion liefern kann, die derjenigen echter Kernsubstanz *nach* Hydrolyse völlig gleicht. Durch Alkoholbehandlung wird das Plasmal in den meisten Fällen restlos entfernt, es gibt aber tierisches Gewebe, das es so hartnäckig festhält, daß auch *nach* der Hydrolyse eine Färbung — eine Pseudofärbung des Plasmals — auftritt. Und es ist natürlich nicht ausgeschlossen, daß auch in pflanzlichen Geweben Substanzen vorkommen könnten, die Plasmal so fest verankern, daß eine solche Pseudofärbung zustande kommen könnte. Wenn bei *Actinomyceten* solche Zellbestandteile vorkommen würden, so müßte aber bei ihnen die Nuclealfärbung auch ohne Hydrolyse gelingen. Das ist aber nicht der Fall. Es wurde bereits erwähnt, daß zu jeder Serie von Präparaten immer Kontrollpräparate ohne Hydrolyse angefertigt wurden.

Diese fielen in allen Fällen negativ aus. Plasmal kann also die Färbung bei *Actinomyceten* keineswegs verursacht haben.

Aber das Plasmalogen soll auch in Fettsubstanzen lokalisiert vorkommen können (*Verne*), und Fettsubstanzen finden sich bei *Actinomyceten*. In den *Stämmen J* und *My* treten sie im sporenlosen Mycel schon in jungen Entwicklungsstadien auf. Wie ausführliche Untersuchungen ergaben, wurde aber von *Stamm A* auf Nährböden verschiedenster Zusammensetzung auch in sehr alten Kulturen niemals Fett gebildet (*v. Plotho*), so daß sein nuclealgefärbtes Zellbild als Vergleichsbasis den anderen Stämmen gegenüber dienen kann. Wie aus den obigen Ausführungen hervorgeht, stimmt aber das Zellbild aller Stämme nach Nuclealfärbung in den entscheidenden Grundzügen vollkommen überein, so daß es als sicher gelten kann, daß das Vorkommen von Fett den Ausfall des nuclealgefärbten Zellbildes nicht beeinflußt. Das gleiche Ergebnis in bezug auf das Erscheinen des Fettes im Nuclealpräparat erhielten *Pietschmann* und *Rippel* für *Bac. mycoides* nach Kultur auf zwölf verschiedenen Nährbodenkombinationen.

Weiterhin könnte im Volutin ein Zellbestandteil gegeben sein, der eine Nuclealfärbung vorzutäuschen imstande wäre. *A. Meyer* spricht in seinen grundlegenden Untersuchungen diesen Reservestoff als eine Nucleinsäureverbindung an, was von *Reichenow* gestützt wurde durch den Nachweis, daß Volutin Phosphor enthält. Nach Untersuchungen dieses Autors stellt Volutin freie Nucleinsäure dar, die nicht an Eiweißkörper gebunden ist. Danach könnte man erwarten, daß Volutin eine positive Nuclealreaktion gibt. Diese Annahme wurde allerdings schon durch die Mitteilung von *Reichenow* zweifelhaft, der an tierischem Zellmaterial feststellte, daß Volutinkörnchen nach der Salzsäurehydrolyse mit *Delafield*s Hämatoxylin nicht mehr darstellbar waren. *Reichenow* nimmt an, daß sie durch die Hydrolyse aus der Zelle herausgelöst wurden. Diese Auffassung ist zutreffend. Wird Actinomycetenmaterial, das reichlich Volutin gespeichert hat, hydrolysiert und mit Methylenblau gefärbt, so kann man auf die übliche Weise durch Versetzen mit verdünnter Schwefelsäure nachweisen, daß es vollkommen volutinfrei geworden ist. Volutin wird durch die Einwirkung der warmen Salzsäure völlig aufgelöst. Es kommt also ebenfalls für eine Färbung nach *Feulgen* nicht in Betracht.

Um festzustellen, ob es sich bei der nuclealpositiven Reaktion der *Actinomyceten* etwa um irgendeinen Reservestoff unbekannter Art handeln könne, wurden verschiedene Stämme auf einer Reihe ganz heterogen zusammengesetzter Nährböden gezogen, die entweder von den sonst zur Kultur verwendeten völlig abwichen, oder durch Hinzufügen großer Mengen von Salzen in weiten Grenzen verändert wurden. Es konnte angenommen werden, daß sich diese grundlegend veränderten

Lebensbedingungen im nuclealen Zellbild auswirken würden, falls dieses durch irgendwelche transitorischen Substanzen im Sinne von Reservestoffen hervorgerufen sei. Nährböden, Wachstum und Sporenbildung der Kulturen geht aus Tabelle III hervor:

Tabelle III.
Wachstum und Sporenbildung auf verschiedenen Nährböden.

Nährboden	*Stamm A*		*Stamm C*		*Stamm D*		*Stamm St*	
	Wa	Spb	Wa	Spb	Wa	Spb	Wa	Spb
Zwiebelagar	++	++	+	+	++	++	+	++
Meerrettichagar	±	±	+	+	+	+	+	+
Senfagar	—	—	±	±	+	+	+	+
Dextroseagar + 15 % $MgSO_4$	+	+	+	+	+	+	++	++
„ + 1 % LiCl	±	+	+	+	+	+	+	+

Wa = Wachstum; Spb = Sporenbildung; ± = gehemmt, aber vorhanden; + = gut; ++ = sehr gut.

Der in Tabelle III an erster Stelle genannte Zwiebelagar wurde in der Weise hergestellt, daß eine mittelgroße, etwa 25 g schwere Zwiebel in möglichst kleine Stücke zerschnitten und mit 100 ccm Aqua dest. und 1,8 % Agar versetzt wurde. Nach Sterilisation im Autoklaven wurde der Nährboden in sterile Reagensgläser oder Petrischalen gegossen. In Reagensglas-Schrägagarkulturen wuchsen auf ihm alle Stämme ausgezeichnet, besonders auch der recht empfindliche *Stamm A*. Auch die Sporenbildung war überall reichlich. In Petrischalen fand überhaupt kein Wachstum statt, was sicher auf die Wirkung des hier mehr zur Geltung kommenden ätherischen Öles zurückzuführen ist. Ein ähnliches Ergebnis wurde mit Meerrettichagar, der im gleichen Verhältnis der Komponenten hergestellt war, erzielt, doch beeinträchtigte hier das ätherische Öl offenbar schon etwas die Entwicklung in den Reagensglaskulturen. Auf Senfagar (25 g fein zerriebene Senfkörner, 100 g Aqua dest. und 1,8 % Agar) war diese noch etwas ungünstiger. *Stamm A* gedieh auf ihm überhaupt nicht. In den beiden weiteren Nährböden wurde gewöhnlicher Dextroseagar mit 15 bzw. 1 % $MgSO_4$ oder LiCl versetzt, was die Entwicklung der Organismen makroskopisch nicht merklich schädigte.

Zur zytologischen Untersuchung wurden in verschiedenen Altersstufen der Kulturen von sämtlichen Stämmen Nuclealpräparate hergestellt. Sie ließen in bezug auf die Lokalisation der nuclealpositiven Substanz sowie den Unterschied ihrer Farbtönung in den entsprechenden Altersstufen keinerlei Abweichung von dem normalen Bild erkennen. Auch zeigten diese Parallelen von ganz heterogenen Nährböden bei der *Feulgen*-Reaktion untereinander die größte Übereinstimmung. Es

dürfte deshalb ausgeschlossen sein, daß es sich bei der Nuclealreaktion um irgendeinen Reservestoff unbekannter Zusammensetzung handelt.

Im Hinblick auf die Möglichkeit, daß für die Nuclealreaktion eine andere als die chromatische Substanz verantwortlich gemacht werden könne, wurde immer dem Vergleich der nuclealpositiven Inhaltskörper der Fragmentations- und Luftsporen besondere Aufmerksamkeit zugewendet. Die obigen Untersuchungen haben erwiesen, daß die *Actinomyceten* „ihre Sporenmembran mit Substanzen ausstatten, die der Hyphenmembran fehlen". Zu diesen Substanzen gehören sicher auch jene, die ihnen den bekannten „Erdgeruch" verleihen, der nur von den Sporen ausgeht und der durch ätherische Öle zustande kommt. Früher stellte man diese Verbindungen in einer besonderen Klasse zusammen, jetzt sind sie als völlig heterogene Verbindungen erkannt, die zum Teil aus freien Aldehyden bestehen (Benzaldehyd = Bittermandelöl), zum Teil als Gemische von Terpenen mit Kohlenhydraten (Aldehyde!) und anderen Verbindungen anzusehen sind. In den Sporen könnte also der Fall gegeben sein, daß Aldehyde zum Inventar der Zelle gehören und eine nucleale Pseudoreaktion verursachen könnten. Es ließen sich aber zwischen dem nuclealgefärbten Körperchen der Fragmentationssporen und dem der Luftsporen auch bei sorgfältigster Beobachtung niemals strukturelle Unterschiede feststellen. Die einzige merkbare Verschiedenheit besteht den Fragmentationssporen gegenüber in der größeren Kondensation und daher tieferen violetten Färbung des Innenkörperchens reifer Sporen.

Durch die obigen Ausführungen wird also die Möglichkeit, es könne sich bei der nuclealpositiven Substanz der *Actinomyceten* um eine andere als die chromatische handeln, ganz wesentlich eingeschränkt.

Das zytologische Bild unter extremen Lebensbedingungen.

Durch die folgenden Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob und in welcher Weise das zytologische Bild durch ganz extreme Lebensbedingungen zu verändern ist. Zur Beeinflussung der Organismen wurden verschiedene ätherische Öle gewählt, da es vor kurzem gelang (*Kehl*), durch sie „die vegetativen und generativen Hyphen von *Mucor mucedo* in sehr verschiedener Art" zu beeinflussen und ihr innerphysiologisches Verhalten umzustimmen. Viele ätherische Öle stellen für höhere und niedere Pflanzen starke Gifte dar, so daß es interessant war, ihre Wirkung auf *Actinomyceten* zu verfolgen.

Verzeichnis der angewendeten Öle. Anisöl (1 a rekt. D. A. B. 6), Bergamottöl (D. A. B. 6), Citronellöl (Java, D. A. B. 6), Cypressenöl (D. A. B. 6), Fenchelöl (rekt. D. A. B. 6), Fichtennadelöl (rekt. Handelsware), Kümmelöl (dopp. rekt., D. A. B. 6), Latschenkieferöl (medizinisch), Nelkenöl (aus Zanzibar Nelken, D. A. B. 6), Pfefferminzöl (D. A. B. 6), Pomeranzenöl (bitter, D. A. B. 6), Thymianöl (I, weiß, D. A. B. 6).

Als Nährboden diente Dextroseagar in Petrischalen. Auf den Deckel der Schale wurde ein Öltropfen innerhalb eines Paraffinringes, der das Auslaufen des Tropfens verhinderte, gebracht. Die Schalen standen bei einer Temperatur von 29° C mit dem Schalendeckel nach unten. In regelmäßigen Zeitabschnitten wurde der Öltropfen erneuert.

Über die Wirkung der Öle unterrichtet die Tabelle IV.

Tabelle IV. Wirkung verschiedener Öle.

Ölwirkung	*Stamm A*		*Stamm B*		*Stamm D*		*Stamm J*	
	Wa	Spb	Wa	Spb	Wa	Spb	Wa	Spb
Nelkenöl	+	+	±	—	++	++	++	++
Zypressenöl	±	—	+	—	+	+	++	++
Bergamottöl	±	—	±	—	+	+	+	+
Citronellöl	+	±	+	±	+	+	+	+
Fichtennadelöl	+	+	±	+	++	++	++	++
Latschenkieferöl	+	+	+	+	++	++	++	++
Kümmelöl	±	—	—	—	±	±	—	—
Pfefferminzöl	±	—	—	—	±	±	±	—
Anisöl	—	—	—	—	—	—	—	—
Fenchelöl	—	—	—	—	+	—	±	—
Thymianöl	—	—	±	—	—	—	—	—
Pomeranzenöl	+	+	+	—	+	+	—	—

Bezeichnungen wie bei Tabelle III.

Die intensivste Wirkung besaßen Anis- und Thymianöl, die so gut wie gar keine Entwicklung zuließen. Fast gleichartig war die Wirkung des Fenchel- und Kümmelöls, auch die des Pfefferminzöls kommt ihr nahe. In diesen Kulturen hatte sich höchstens am Schalenrand, wo der Einfluß der Öldämpfe durch die eindringende Außenluft gemildert wurde, geringes Wachstum entwickeln können. Von diesen Ölen ähneln sich Anis- und Fenchelöl in ihrer chemischen Zusammensetzung; sie enthalten beide einen hohen Prozentsatz Anethol [p-Propenylanisol (*Bernthsen*)]. Kümmel- und Thymianöl weichen jedoch in ihrer chemischen Konstitution von ihnen beträchtlich ab. Es sind Substanzen auf terpenartiger Grundlage in Verbindung mit Kohlenwasserstoffen, zu denen manchmal Aldehyde treten, wie beim Kümmelöl der Cuminaldehyd. Thymianöl besteht aus dem Terpen Thymen, dem Kohlenwasserstoff Cymol und einem Homologen des Phenols, dem Thymol (*Bernthsen*). So kann der Schluß, daß eine bestimmte Wirkung von bestimmten gemeinsamen Bestandteilen der Öle hervorgerufen werde, nicht gezogen werden. Charakteristisch sind auch die Wirkungen, die von den Koniferenölen ausgehen: sie fördern bei den meisten *Actinomyceten* die Entwicklung. Die übrigen ätherischen Öle wirken ziemlich wenig charakteristisch. Erwähnt sei noch, daß *Stamm My*, der in der Tabelle nicht aufgeführt ist, als einziger auf Pomeranzenöl ein äußerst kräftiges Wachstum ohne jegliche Verbildungen zeigte. Vielleicht besitzt dieses Öl irgendwelche Übereinstimmung mit dem in *Myrica Gale*.

Die zahlreichen morphologischen Verbildungen des Mycels können hier nicht beschrieben werden, es interessiert allein das mikroskopische Zellbild nach *Feulgen*-Färbung. Bei den durch das Öl nicht geschädigten

Kulturen stimmte es vollständig mit den üblichen zytologischen Befunden überein. Die geschädigten Mycelien konnten nur ganz schmale Hyphen erzeugen, die schwache aber deutliche diffuse Färbung zeigten. Wenn in der Kultur die Sporenbildung *unterdrückt* war, so zeigte sich nur in wenigen Fäden eine unregelmäßige Zerteilung des Plasmas in lange diffus gefärbte Teilstücke, die aber nie bis zur Zerlegung in stäbchenförmige oder gar kugelige Elemente fortschritt. Die Teilstücke färbten sich nicht merkbar dunkler als der Inhalt der ungeteilten Fäden, eine Plasmakondensierung fand also nicht statt. Irgendwelche Strukturen waren in den Teilstücken nicht zu beobachten. Die *Hemmung* der Sporenbildung ließ sich am mikroskopischen Bild meist besser erkennen als am makroskopischen. In den Fäden lagen dann zahlreiche stäbchenförmige, diffus gefärbte Plasmaelemente, aber nur wenige runde. Ein weiteres mikroskopisches Kennzeichen für die Hemmung der Sporenbildung war das Ausbleiben der Verbreiterung der sporogenen Fäden. Die Sporen selbst waren immer kleiner als bei normalem Wachstum, ihr Strukturbild aber war normal. In Involutionsformen wurden niemals dunkler gefärbte Bezirke beobachtet, sie zeigten völlig gleichmäßige, aber schwache diffuse Färbung. Diese Angaben gelten für alle Stämme, sie zeigten untereinander keine Abweichungen in bezug auf die hier erwähnten Untersuchungen.

So ergaben also auch diese unter ganz ungewöhnlichen Lebensbedingungen stehenden Kulturen ein zytologisches Bild, das in seinen Grundzügen mit dem normalen vollkommen übereinstimmte.

Die Färbung durch gewöhnliche „Kernfarbstoffe".

Während in den bisher besprochenen Untersuchungen das Verhalten der fraglichen Substanz der *Actinomyceten* gegenüber kulturellen Variationen geprüft wurde, sollte durch die im folgenden beschriebenen Beobachtungen ihre Einstellung zu färberischen Einflüssen ermittelt werden.

Über die Affinität gewisser Farbstoffe zu bestimmten Zellstrukturen liegen eine Reihe von umfassenden Arbeiten vor (*Michaelis* und *Rona*). Es hat sich mit Sicherheit nachweisen lassen, daß bei bestimmten Färbungen chemische Prozesse ablaufen und daß auch Faktoren rein physikalischen Charakters, wie Adsorptionsverhältnisse oder gegenseitige Löslichkeit der aufeinander einwirkenden Komponenten, in Betracht kommen. Auch die Wasserstoffionenkonzentration spielt eine Rolle.

Auf Grund dieser Untersuchungen wurden nach und nach eine Reihe von Farbstoffen herausgestellt, die als spezifische Kernfarbstoffe angesprochen wurden. Wenn der positive Ausfall der Nuclealreaktion in den Zellen der *Actinomyceten* auf chromatische Substanz zurückgeführt werden soll, so mußte erwartet werden, daß wenigstens mit

einigen dieser Kernfarbstoffe ähnliche zytologische Bilder zu erreichen waren wie sie mit der *Feulgen*-Färbung entstanden. Um dies zu prüfen, wurden die *Actinomyceten* mit mehreren Kernfarbstoffen behandelt.

Als hoch spezifischer Kernfarbstoff gilt Methylgrün-Essigsäure. Lebendes Gewebe wird in einem Tropfen einer Lösung von 0,5 bis 1 %igem Methylgrün in 0,75 %iger Essigsäure verrieben. Nach einer Färbezeit von 20 bis 30 Minuten treten die typischen Plasmateilungen in den sporogenen Fäden durch dunklere Färbung deutlich hervor. Die vegetativen Fäden sind gleichmäßig blaßgrün gefärbt. Die Querwände in den älteren sporulierenden Hyphen von *Stamm A* und *B* zeigten dunkle, graugrüne Farbe und ließen sich sehr deutlich erkennen, jedoch nicht die Protoplasmakörnchen im Innern der Zellen. Auch bei den Sporen der anderen Stämme traten sie nicht hervor. Ob das auf die besprochenen Einlagerungen in den betreffenden Membranen zurückzuführen ist, muß dahingestellt bleiben.

In mit *Giemsa*-Lösung gefärbten Präparaten waren bei allen untersuchten Stämmen ganz junge Hyphen gleichmäßig blau gefärbt. Etwas ältere Kulturen zeigten neben homogen blau gefärbten Fäden andere mit dunklen rotstichigen Einschlüssen von stäbchenförmiger Gestalt, in noch älteren war deutliche „Kammerung“ zu unterscheiden. Zwischen rechteckigen bis runden, dunkel gefärbten Elementen lagen mehr oder weniger große ungefärbte Strecken, in denen sich kein Plasma befindet, die verbindende, ganz schwach blau gefärbte Membran war deutlich erkennbar. Die verbreiterten, Luftsporen bildenden Hyphen hatten einen grünlichblauen Farbton angenommen. Sie ließen in jungen Stadien das eingeschlossene Plasmakörnchen deutlich hervortreten, in reifen Sporen war es nur schwach erkennbar. Auch in den Fragmentationssporen kam das Plasmakörnchen durch dunklere Farbtönung zum Ausdruck. Die Ergebnisse der Färbung mit der *Giemsa*-Lösung stimmten bei allen Stämmen untereinander überein.

Durch die Differenzierung mit 1 %iger Eosinlösung, wie sie *Badian* empfiehlt, konnten nie andere Ergebnisse erzielt werden, insbesondere traten die von ihm beobachteten „Chromatinstäbchen“ nicht hervor.

Die Eisenhämatoxylinfärbung nach *Heidenhain* wird von vielen Autoren einer basischen Anilinfärbung vorgezogen, da sie strukturgetreuer und daher verläßlicher arbeiten soll. Im großen und ganzen soll sie zum „Tatsachenbereich der Durchtränkungsfärbung“ (*Bauer*) gehören und strukturfremde Niederschläge sollen bei ihr verhältnismäßig selten vorkommen. Nach verschiedenen Versuchen, bei denen die optimalen Zeiten für Vorbeize und Färbung ausprobiert wurden, gelang es für beide die günstigsten Bedingungen herauszufinden. Das Material wurde nun 7 Stunden vorgebeizt und blieb 12 bis 14 Stunden in der eigentlichen Farblösung. Dann wurde mit Eisenalaunlösung differenziert,

bis makroskopisch keine Färbung mehr wahrzunehmen war, worauf das Präparat für kurze Zeit von neuem in die Farblösung gelegt und wieder bis zur Entfärbung differenziert wurde. Dieses Wechseln von Färben und Differenzieren mußte mehrere Male wiederholt und schließlich der Grad der Entfärbung mit der Wasserimmersion kontrolliert werden. Dann gelingt eine gleichmäßige Anfärbung der Hyphen, wobei die sporogenen Fäden einen tieferen Grauton behalten als die vegetativen. In den einzelnen Sporenzellen tritt die Schwärzung eines kleinen Bezirks deutlich heraus. Dieser Bezirk ist nicht scharf begrenzt, sondern allmählich nach außen hin abgetönt. Die hellgrau konturierte Membran erscheint weniger verdickt als in hydrolysiertem Sporenmaterial. Die Befunde waren für alle Stämme die gleichen.

Schließlich seien noch die Versuche mit Carminessigsäure erwähnt. Sie wurde von *Heitz* zum ersten Male verwendet und besitzt nach ihm hohe Spezifität für typische Kernsubstanz. Auch *Piekarski* verwendete sie zu zytologischen Untersuchungen mit gutem Erfolg. Bei meinen Versuchen konnte ich jedoch immer nur eine alle Mycelteile gleichmäßig blaßrot färbende Reaktion feststellen. Auch nachdem die Präparate mit Normalsalzsäure behandelt worden waren, stimmte die Färbung nicht mit den übrigen überein, jedenfalls ging die Differenzierung des Mycels durch sie keineswegs so weit wie bei der *Giemsa*- und Hämatoxylinmethode.

Die Ergebnisse der Färbung mit den beiden eben genannten Methoden aber, sowie die mit Methylgrün-Essigsäure besitzen bei allen Stämmen große Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Nuclealreaktion, so daß sie als Erhärtung für den Schluß auf chromatische Substanz wohl herangezogen werden dürfen.

Endlich wurde versucht, mit Hilfe der Photographie im ultravioletten Licht am lebenden Material eine Bestätigung der mitgeteilten Ergebnisse zu gewinnen, doch waren hierbei in Hyphen und Sporen keinerlei Strukturen erkennbar. Ein Grund für das Versagen dieser Untersuchungen kann vorläufig nicht angegeben werden.

Rückblick.

Die Untersuchungen mit der *Feulgen*-Reaktion haben ergeben, daß in den Zellen der *Actinomyceten* die reagierende Substanz in allen Entwicklungsstadien auf das ganze Plasma verteilt ist. Für seine qualitative Charakterisierung ist der Ausfall der Färbung beweisend: es finden sich im Zellplasma nucleale Substanzen, und aus Unterschieden der Intensität der Färbung können dann Schlüsse auf die Plasmakondensierung und somit die Konzentration der Nuclealkörper gezogen werden. Auf der schwankenden Größe der Dichte des Plasmas und der darin ver-

teilten nuclealpositiven Substanz beruht die Tatsache, daß uns die junge Hyphe schwächer nuclealgefärbt erscheint als die reife Spore. Im Gegensatz zu der überaus großen chemischen Mannigfaltigkeit der Proteinkomponente weist die durch die *Feulgen*-Reaktion charakterisierte nucleale Komponente des Nucleoproteids bei Pflanzen und Tieren die größte Einheitlichkeit auf, sie besteht aus Thymonucleinsäure. Diese liegt also höchstwahrscheinlich auch bei *Actinomyceten* vor.

Bereits in der Einleitung wiesen wir darauf hin, daß bei diffuser Reaktion der Schluß auf Thymonucleinsäure nicht ohne weiteres gezogen werden kann. Die *Feulgen*-Reaktion erfaßt nicht spezifisch das Kohlenhydrat der Thymonucleinsäure, die Desoxyribose, sie ist vielmehr eine allgemeine Aldehydreaktion, und es besteht die Möglichkeit, daß „bei der großen Anzahl der in der Zelle vorhandenen organischen Verbindungen" unter Umständen sich auch in ihr Aldehyde befinden können, die nichts mit der Thymonucleinsäure zu tun haben. Es muß daher durch geeignete Methoden versucht werden, den Nachweis zu erbringen, daß unter den denkbar verschiedensten Untersuchungs- und Lebensverhältnissen Auftreten und Art der Nuclealreaktion unverändert bleiben. Dieser Nachweis wurde durch die mitgeteilten Untersuchungen erbracht.

Es ergab sich, daß bei einer Reihe von Fixierungsmitteln verschiedenen chemischen Charakters immer das gleiche Zellbild entstand. Das Fixierungsmittel kann also für sein Entstehen nicht verantwortlich gemacht werden.

Es wurde gezeigt, daß durch niedrigere oder höhere Hydrolysentemperatur und entsprechendes Variieren der Hydrolysendauer eine Beeinflussung der reagierenden Substanz nach Auftreten und Lokalisation nicht möglich ist.

Weiterhin wurde die Möglichkeit einer Entstehung der positiven Reaktion durch andere Stoffe erörtert und diese Stoffe für die in Frage stehenden Organismen ausgeschlossen.

Dann wurde durch Kulturen unter ganz unnormalen Lebensbedingungen gezeigt, daß auch unter diesen extremen Verhältnissen das zytologische Bild in seinen Grundzügen mit dem normalen vollkommen übereinstimmt.

Endlich wurde ermittelt, daß durch Farbstoffe, denen man Spezifität für typische Kernsubstanz zuspricht, in den meisten Fällen das gleiche Zellbild entstand wie mit der mikroskopischen Reaktion nach *Feulgen*.

Durch alle diese Untersuchungen wurde erwiesen, daß die reagierende Substanz einen permanenten, umweltstabilen, unbeeinflußbaren Zellbestandteil darstellt. Diese Feststellung, der positive Ausfall der Nuclealreaktion und die mit spezifischen Kernfarbstoffen erhaltenen Bilder sprechen mit höchster Wahrscheinlichkeit für die Kernnatur der

reagierenden Substanz. Für diese Annahme sei hier noch eine weitere Stütze angeführt:

Für die verschiedenen Fixierungsmittel wurde nachgewiesen, daß die Abhängigkeit der maximalen Färbbarkeit von der Hydrolysendauer bei der färbbaren Substanz der *Actinomyceten* den gleichen Verlauf zeigt wie bei der Kernfärbung an höheren Organismen. Das deutet auf ihre Kernnatur hin. Denn wenn die Maximalfärbung fraglicher Substanzen schon durch viel schwächere Hydrolyse bewirkt wird, wie z. B. bei den *Nissl*-Schollen (*Redenz*) oder gar ohne Hydrolyse auftritt, wie beim Volutin (*Reichenow*), so beweist das, daß keine echte chromatische Substanz vorliegt.

Endlich sei noch darauf hingewiesen, daß von *Epstein* und anderen bei einem nahen Verwandten der *Actincmyceten*, dem *Tuberkelbazillus*, der Nachweis auf Thymonucleinsäure bereits erbracht worden ist.

Aus allen Beobachtungen darf daher der Schluß gezogen werden: in der hier untersuchten Substanz liegt die nucleinsäurehaltige Komponente des Karyotins vor; *die Actinomyceten besitzen Thymonucleinsäure.*

Gegenüber den ständig wiederholten Einwänden ist, wie *Bauer* (S. 245) sehr richtig sagt, zu verlangen, „daß das Vorhandensein von organischen Verbindungen, aus denen sich bei gleicher Behandlung wie für chromatische Strukturen Aldehydgruppen freimachen lassen, die aber strukturgebunden bleiben, erst einmal nachgewiesen wird". Es ist kaum anzunehmen, daß ein solcher Nachweis an sehr vielen Stoffen der Zelle zu führen sein wird. Der eindeutig positive Ausfall einer sorgfältig ausgeführten Reaktion mit richtiger Farbnüance zeigt vielmehr auch bei diffuser Färbung mit großer Wahrscheinlichkeit das Vorhandensein von Thymonucleinsäure an. Auch *Caspersen* bemerkt, daß trotz des Charakters der *Feulgen*-Reaktion als allgemeiner Aldehydreaktion andere Zellbestandteile, die ein positives Ergebnis aufweisen könnten, bestimmt nicht in Mengen vorkommen.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung des Reichsforschungsrates am mikrobiologischen Institut der Universität Göttingen ausgeführt.

Literatur.

Badian, J., diese Zeitschr. **4**, 409, 1933. — *Derselbe*, Acta Soc. Bot. Pol. **18**, 120, 1936. — *Bauer, H.*, Zeitschr. f. Zellforschg. u. mikr. Anat. **15**, 225, 1932. — *Berg, W.*, Zeitschr. f. mikr. Anat. Forschg. **7**, 421, 1926. — *Bernthsen, A.*, Lehr. d. organ. Chem. Braunschweig, Friedr. Vieweg & Sohn, 1924. — *Boas, F.*, u. *O. Biechele*, Biochem. Zeitschr. **254**, 467, 1932.

Caspersen, T., Scand. Arch. Physiol. **78**, 4, 1934, Suppl.-Nr. 8. — *Coleman, L. C.*, Stain Technol. **18**, 123, 1938.

Epstein, G. W., E. D. Ravich-Birger u. *A. A. Svinkina*, Gior. d. batter. e. immunol. **16**, 1, 1936.

Feulgen, R., u. *H. Rossenbeck*, Zeitschr. f. phys. Chem. **135**, 203, 1924. — *Feulgen, R., M. Behrens* u. *S. Mahdihassan*, Zeitschr, f. physiol. Chem. **246**, 203, 1937. — *Feulgen, R.*, Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmeth., Abt. V, Bd. 2, 1055, 1926.

Geitler, L., Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **53**, 270, 1935.

Heitz, E., Zeitschr. f. indukt. Abstammungslehre **70**, 402, 1935. — *Hillary, B. B.*, Botan. Gazette **101**, 276, 1939.

Kehl, H., diese Zeitschr. **8**, 383, 1937. — *Klein, G.*, Handb. d. Pflanzenanalyse, Spez. Anal. Teil II, 1932.

Lachner-Sandoval, R., Über Strahlenpilze. Diss. Straßburg 1898. — *Lehmann-Neumann*, Bd. II. München, J. F. Lehmann, 1927. — *Lieske, R.*, Morph. u. Biol. d. Strahlenpilze. Berlin, Gebr. Borntraeger, 1921.

Meyer, A., Bot. Ztg. **62**, 113, 1904. — *Michaelis, L.*, u. *P. Rona*, Biochem. Zeitschr. **97**, 57, 1919. — *Milovidov, P. F.*, Protoplasma **25**, 570, 1936. — *Derselbe*, ebenda **31**, 246, 1938.

Petter, H., C. r. Acad. Sci. Paris **197**, 88, 1933. — *Pietschmann, K.*, u. *A. Rippel*, diese Zeitschr. **3**, 422, 1932. — *Piekarski, H.*, Centralbl. f. Bakt. I. Orig. **144**, 140, 1939. — *v. Plotho, O.*, diese Zeitschr. **11**, 33, 1940.

Redenz, E., Verh. d. phys. med. Ges. Würzburg **49**, 81, 1924. — *Reichenow, E.*, Arch. f. Protistkde. **61**, 144, 1928. — *Rippel, A.*, u. *P. Witter*, diese Zeitschr. **5**, 24, 1934.

Sauvageau, C., u. *M. Radais*, Ann. d. l'Inst. Pasteur **6**, 242, 1892. — *Schaede, R.*, Planta **29**, 32, 1938. — *Derselbe*, diese Zeitschr. **10**, 473, 1939. — *Schussnig, B.*, Vergl. Morphol. d. niedr. Pflanzen I. Berlin, Gebr. Borntraeger, 1938. — *Stille, B.*, diese Zeitschr. **8**, 125, 1937.

Verne, J., C. r. Soc. Biol. **99**, 266, 1928.

(Aus dem Botanischen Laboratorium und dem Medizinisch-Chemischen Institut der Universität Upsala, Schweden.)

Untersuchungen über Methangärung und die dabei wirksamen Bakterien.

Von

Torsten Wikén.

(Eingegangen am 16. Juli 1940.)

Während eines Aufenthaltes im Mikrobiologischen Laboratorium der Technischen Hochschule in Delft, Holland, bei Herrn Prof. *A. J. Kluyver* begann ich im Frühsommer 1938 experimentelle Untersuchungen über die Physiologie der Methanbakterien. Einige der bei diesen Studien erhaltenen Versuchsergebnisse können in folgenden Punkten kurz zusammengestellt werden.

I.

Es wurde eine Reihe von Stammkulturen von Methanbakterien auf einfachen Alkanolen, Alkancarbonsäuren und Alkanonen als organischen Substraten hergestellt. Dabei wurde *Winogradskijs* klassische Methode der elektiven Kultur verwendet, bei gleichzeitiger genauer Beachtung der charakteristischen Besonderheiten in der Physiologie der betreffenden Bakterien, über die wir auf Grund der von *Söhngen* (1906) und *Barker* (1936) ausgeführten methodologischen Arbeiten unterrichtet sind.

Besonderes Gewicht wurde darauf gelegt, die Überimpfungsmethodik zu einem hohen Grad von Reproduzierbarkeit auszubilden, was wegen der Heterogenität des Primärimpfmaterials große Schwierigkeiten verursacht. So erhielt *Barker* (1936, 1937) bei seinen Überimpfungen auf Äthylalkohol Methangärung, wobei in der flüssigen Phase manchmal nur Essigsäure, manchmal aber Essigsäure neben großen Mengen von Buttersäure und Capronsäure gebildet wurde.

Durch die Verwendung sehr kleiner Sedimentmengen als Infektionsmaterial bei der Überimpfung auf neue Kulturmedien mit maximalen Mengen der betreffenden organischen Substrate und einem reichlichen Bodensediment von Siliciumdioxyd, Calciumcarbonat oder feinfaserigem Asbest konnte eine für Stammkulturen wesentliche Eigenschaft, nämlich große Beständigkeit, erreicht werden. Solche Kulturen haben 3 bis 6 Monate gegoren, und der Bakterienstamm behielt dabei seine Fähigkeit, in neuen Medien schnell Gas zu bilden. Die in den Bodensedimenten

dieser durch sukzessive Überimpfungen hergestellten Stammkulturen vorkommenden Massenproduktionen von Bakterien weisen eine hochgradige morphologische und physiologische Homogenität auf.

II.

In seiner 1906 veröffentlichten, für die moderne Methanbakterienforschung grundlegenden Dissertation stellte *Söhngen* die allgemeine Regel auf, daß aliphatische Carbonsäuren mit einer ungeraden Anzahl von Kohlenstoffatomen im Molekül nicht anaerob unter Bildung von Kohlendioxyd und Methan vergoren werden können. Die einzige Ausnahme von dieser Regel stellt nach *Söhngen* die Ameisensäure dar. Über die Calciumsalze der Propionsäure und Valeriansäure schreibt *Söhngen* auf S. 94 der erwähnten Arbeit: „Bij de vele pogingen echter om calciumpropionaat in gisting te brengen, werd geen resultaat verkregen. Noch met groote hoeveelheden rioolmodder, noch met de meest actieve kulturen van butyraatgistingen geinfecteerd, werden oplossingen van 1 % à 2 % propionaat in 100 duinwater, 0,05 K_2HPO_4, 0,05 NH_4Cl onder gasontwikkeling ontleed. Evenmin slaagden de proeven met calciumvaleraat.“ *Söhngen* prüfte auch die Calciumsalze der Heptyl- und Nonylsäure mit negativem Ergebnis.

Thayer (1931) fand, daß die Natriumsalze der Propion-, *n*- und Isovaleriansäure sowie Heptylsäure durch in Süß- und Salzwasser sowie in Schlamm lebende Bakterien in anaerobe Methangärung versetzt werden können. *Thayer* stellte jedoch keine Überimpfungsversuche an und mikroskopierte auch das Sediment der Rohkulturen nicht.

Bei der Infektion von Calciumpropionatmedien mit Schlamm von verschiedenen Orten erhielt ich meist eine kräftige Bildung von Kohlendioxyd und Methan. Ein Schlamm aus einer Tiefe von 2 m im Fluß Fyris bei „Övre Föret“, etwa 3 km südsüdöstlich von Upsala, erwies

Tabelle I. Die quantitative Zusammensetzung der Gasphase über einer Rohkultur auf Calciumpropionat.

Das Volumen des Gasrezipienten ist 450 ml. Die Analysenzahlen sind Mittelwerte für Zeitintervalle von etwa 10 Stunden.

Datum	ml CO_2	ml CH_4	CO_2/CH_4	Datum	ml CO_2	ml CH_4	CO_2/CH_4
19. XII. 1939	5,1	14,0	0,364	27. I. 1940	3,5	14,2	0,246
	5,3	14,6	0,363		2,8	11,5	0,243
10. I. 1940	3,0	11,3	0,266	29. I. 1940	2,4	9,7	0,247
	3,7	14,3	0,259		2,4	9,6	0,250
	2,7	10,3	0,262	3. II. 1940	3,8	11,3	0,336
15. I. 1940	3,4	12,6	0,270	4. II. 1940	4,2	11,5	0,365
	3,1	11,5	0,270	5. II. 1940	4,5	11,8	0,381
16. I. 1940	2,8	11,4	0,246	6. II. 1940	5,2	12,9	0,403
	2,6	10,4	0,250	7. II. 1940	5,3	13,1	0,405
	3,0	12,3	0,244	9. II. 1940	5,3	12,9	0,411
				10. II. 1940	5,1	12,7	0,402
18. I. 1940	2,6	11,2	0,232	11. II. 1940	5,2	12,8	0,406
	3,3	14,2	0,232	17. II. 1940	4,5	12,2	0,369
				27. II. 1940	4,9	11,8	0,415
19. I. 1940	3,0	12,8	0,234				
	3,0	12,8	0,234				

sich als so aktiv, daß die Gasbildung der Rohkulturen schon nach etwa 15 Stunden bei 20° C mit großer Intensität einsetzte. Die quantitative Zusammensetzung der Gasphase über einer solchen Rohkultur ist aus Tabelle I zu ersehen.

Das Sediment der Propionatkulturen enthält eine sehr voluminöse *Sarcina* von der Größenordnung 10 bis 14 μ. Durch sukzessive Überimpfung konnte sie in Massenproduktion erhalten werden.

Die für die Propionatspaltung der *Methanosarcina* optimale Wasserstoffionenkonzentration liegt wie bei anderen bisher studierten Methangärungen beim oder gleich unterhalb des Neutralpunktes. Bei der Bestimmung des p_H in 20 Propionatkulturen mit maximaler Gärungsintensität wurden als Extremwerte 6,5 und 7,0 gefunden.

III.

Die Methangärung des Acetons ist vom bakteriologischen Standpunkt aus bisher nur von *Mazé* (1915) studiert worden. Er infizierte Nährlösungen mit einem Gehalt von 1 bis 2 Vol.-% Aceton mit kleinen Düngermengen. Nach Zeiträumen von mehreren Monaten im anaeroben Milieu (Vakuum!) trat Bildung von Kohlendioxyd und Methan ein.

Im Sediment fand *Mazé* eine *Sarcina*, ein fädenbildendes *Stäbchen* und einen kurzen *Diplobacillus*. Jeder dieser Typen war zu verschiedenen Zeitpunkten im Leben der Kulturen vorherrschend.

Mazé führte mit seinen acetonvergärenden Methanbakterien keine Überimpfungsversuche auf elektivem Medium aus.

Die von mir als Infektionsmaterial benutzten Schlammtypen von verschiedenen Fluß- und Seeböden erwiesen sich in den meisten Fällen gegenüber Aceton als aktiv. Nach einer Inkubationszeit von etwa 20 Stunden bis 3 Wochen trat in den Rohkulturen mit zunehmender Intensität Bildung von Kohlendioxyd und Methan auf.

Der Schlamm der Rohkulturen enthält unbewegliche, manchmal fast isodiametrische, fädenbildende Stäbchen. Die Fäden liegen meistens parallel und in großen Bündeln dicht aneinander, sie können aber auch gewunden in knäuelartigen, für das bloße Auge sichtbaren Aggregaten liegen. Diese Bakterien erinnern stark an den von *Söhngen* (1906) und *Barker* (1936) in methangärenden Acetat- und Butyratkulturen beschriebenen Typus, den *Barker* als *Methanobacterium Söhngenii* bezeichnet. In einigen wenigen Kulturen findet sich außerdem ein *Micrococcus*, der außerordentlich dichte maulbeerartige Aggregate bildet, und ein linsenförmig ovaler Bakterientypus, dessen Zellen einzeln oder seltener paarweise vereinigt liegen.

Die *Methanobacterium*- und *Methanococcus*-Formen wurden durch Überimpfung auf elektivem Medium mit künstlichem Sediment in Massenproduktion erhalten.

Die Wasserstoffionenkonzentration der Acetonkulturen liegt bei maximaler Gärungsintensität in der Regel dicht unterhalb des Neutralpunktes.

IV.

Die folgenden morphologischen Haupttypen von Methanbakterien können im Sediment der Kulturen unterschieden werden:

a) Auf Propylalkohol und Formiat: Relativ lange, oft etwas gebogene, unbewegliche Stäbchen, die einzeln oder seltener zu kurzen Einzelfäden vereinigt liegen. Dieser Bakterientypus ist sehr wahrscheinlich mit dem von *Barker* (1936, 1937) in Methangärungen auf Äthyl- und Butylalkohol beschriebenen *Methanobacterium Omelianskii* identisch.

b) Auf Acetat, Propionat und Butyrat: Unbewegliche *Sarcina* von wechselnden Dimensionen. Die acetat- und butyratvergärenden Formen sind wahrscheinlich mit *Methanosarcina methanica (Smit) Kluyver et van Niel* identisch, während die propionatvergärende Form einem in Dimensionen und Verhalten bei der Färbung etwas abweichenden Typus zuzugehören scheint.

c) Auf Butyrat und Aceton: Ein *Methanococcus* in nach Größe und Form variierenden Aggregaten und mit charakteristischen Cysten. Die butyratvergärende Form ist allem Anschein nach mit *Methanococcus Mazei Barker* identisch.

d) Auf Acetat, Butyrat und Aceton: Der oben unter III. beschriebene, an *Methanobacterium Söhngenii Barker* erinnernde Bakterientypus.

Ob die im Sediment der Acetonkulturen vorkommenden linsenförmigen Zellen als Methanbakterien zu betrachten sind, konnte noch nicht mit Sicherheit entschieden werden.

Versuche zur Herstellung von Einzellkulturen der oben genannten Bakterientypen mittels der mikrurgischen Technik sind im Gange.

V.

Die mikroskopische Untersuchung des Bodensediments der sukzessiven Überimpfungen wurden mit Serienanalysen der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der zugehörigen Gasphasen verbunden. Das Ergebnis der Überimpfungen wurde also durch fortlaufende Analyse einer physiologischen Eigenschaft des betreffenden Systems kontrolliert. Die Notwendigkeit einer derartigen kombinierten Kontrollmethode ist leicht einzusehen, da ja der als Infektionsmaterial benutzte Schlamm eine besonders heterogene Kombination von Organismen darstellt und da die Bakterien eine vom morphologischen Gesichtspunkt aus relativ unausgeprägte Gruppe darstellen, für deren Systematik die

physiologische Charakterisierung oft von ausschlaggebender Bedeutung ist.

Die Volumina der auf den Kulturflaschen befestigten Gasrezipienten wurden je nach der Intensität der Gärungen so gewählt, daß die bei der fortlaufenden Kontrolle der Zusammensetzung der Gasphasen erhaltenen Analysenzahlen die Mittelwerte für relativ kleine Zeitintervalle darstellen.

Söhngen (1906) gibt an, daß die Gasphase über den Kulturen auf fettsauren Calciumsalzen eine konstante, für jede Fettsäure charakteristische quantitative Zusammensetzung aufweist, die einer bestimmten Formel für die Spaltung des betreffenden Salzes entspricht. Diese Beobachtung von *Söhngen* kann durch meine bei der Überimpfungskontrolle serienweise ausgeführten Gasanalysen nicht bestätigt werden. Im Gegenteil kann beim Quotienten Kohlendioxyd/Methan eine Variation mit größeren und kleineren Amplituden und einer offenbaren Neigung zur Periodizität festgestellt werden. Während der ersten Kulturperiode, wenn die flüssige Phase physikalisch und chemisch (Bicarbonatbildung!) mit den Gärungsgasen gesättigt wird, gibt sich diese Variation oft in treppenförmiger Diskontinuität im Anstieg des Quotienten zu erkennen.

Eine gleichartige Variation wurde bei der Gasphase über Acetonkulturen gefunden.

Die Tabellen II bis IV geben eine Vorstellung von den Amplituden der Variation in der Gasphase über Formiatkulturen.

Tabelle II. Die quantitative Zusammensetzung der Gasphase über einer mehrmals überimpften Kultur auf Calciumformiat. Asbestsediment. Das Volumen des Gasrezipienten ist 25 ml. Die Analysenzahlen sind Mittelwerte für Zeitintervalle von 1 bis 2 Stunden.

Datum 1940	ml CO_2	ml CH_4	CO_2/CH_4	Datum 1940	ml CO_2	ml CH_4	CO_2/CH_4
13. II.	9,2	9,2	1,000	27. II.	8,3	9,6	0,865
14. II.	9,0	9,9	0,909	28. II.	8,1	9,8	0,827
	7,9	8,7	0,908	29. II.	6,7	8,0	0,838
16. II.	6,7	10,5	0,638	7. III.	3,6	3,7	0,973
	5,3	8,4	0,631	9. III.	5,1	4,5	1,133
17. II.	7,5	9,4	0,798	10. III.	7,0	7,0	1,000
18. II.	8,3	9,2	0,902	12. III,	7,4	7,7	0,961
22. II.	5,2	5,3	0,981	13. III.	7,5	7,1	1,056
23. II.	9,2	8,6	1,070	14. III.	7,9	6,9	1,145
24. II.	9,0	9,0	1,000	15. III.	7,9	7,3	1,082
	8,7	8,7	1,000	18. III.	5,7	7,8	0,731
25. II.	8,3	9,5	0,874	20. III.	6,5	8,0	0,813
	8,4	9,7	0,866	21. III.	6,4	7,8	0,821
				25. III.	5,2	6,0	0,867

Tabelle III. Die quantitative Zusammensetzung der Gasphase über einer mehrmals überimpften Kultur auf Calciumformiat. Asbestsediment. Das Volumen des Gasrezipienten ist 35 ml. Die Analysenzahlen sind Mittelwerte für Zeitintervalle von 1 bis 2 Stunden.

Datum 1940	ml CO_2	ml CH_4	CO_2/CH_4	Datum 1940	ml CO_2	ml CH_4	CO_2/CH_4
2. III.	8,2	9,1	0,901	15. III.	6,7	7,9	0,848
4. III.	8,5	8,2	1,037	18. III.	5,5	7,8	0,705
5. III.	7,7	8,1	0,951	20. III.	6,6	8,0	0,825
6. III.	6,9	9,0	0,767	21. III.	6,6	7,5	0,880
7. III.	6,4	8,2	0,781	22. III.	6,7	7,2	0,931
8. III.	6,6	8,4	0,786	23. III.	7,0	7,0	1,000
9. III.	5,0	4,5	1,111	25. III.	7,2	7,1	1,014
10. III.	7,8	6,7	1,164	26. III.	6,5	6,9	0,942
11. III.	7,7	7,4	1,041	27. III.	6,2	7,7	0,805
12. III.	6,8	7,5	0,907	28. III.	5,9	8,2	0,720
13. III.	6,3	7,2	0,875	30. III.	5,8	7,7	0,753
14. III.	6,6	7,7	0,857				

Tabelle IV. Die quantitative Zusammensetzung der Gasphase über einer mehrmals überimpften Kultur auf Calciumformiat. Calciumcarbonatsediment. Das Volumen des Gasrezipienten ist 30 ml. Die Analysenzahlen sind Mittelwerte für Zeitintervalle von 1 bis 2 Stunden.

Datum 1940	ml CO_2	ml CH_4	CO_2/CH_4	Datum 1940	ml CO_2	ml CH_4	CO_2/CH_4
2. III.	6,8	8,7	0,782	11. III.	7,0	7,9	0,886
3. III.	7,8	7,8	1,000	12. III.	6,9	8,0	0,863
4. III.	7,6	7,9	0,962	13. III.	6,9	7,8	0,885
5. III.	8,1	8,5	0,953	14. III.	6,7	6,6	1,015
6. III.	6,9	8,9	0,775	15. III.	7,3	7,2	1,014
7. III.	6,3	8,9	0,708	18. III.	6,6	6,9	0,957
8. III.	5.9	8,7	0,678	20. III.	5.8	8,2	0,707
9. III.	4,8	4,9	0,980	21. III.	6,0	8,1	0,741
10. III.	7,4	7,5	0,987				

Literatur.

H. A. Barker, diese Zeitschr. 7, 404, 1936. — *Derselbe*, ebenda, S. 420. — *Derselbe*, ebenda 8, 415, 1937. — *P. Mazé*, C. r. Soc. Biol. 78, 398, 1915. — *N. L. Söhngen*, Het ontstaan en verdwejnen van Waterstof en Methaan onder den invloed van het Organische Leven. — J. Vis, Jr., Delft. Dissertation, Delft 1906. — *L. A. Thayer*, Bull. Amer. Assoc. Petroleum Geol. 15, 441, 1931.

(Aus dem Institut für physiologische Botanik der Universität Upsala.)

Weitere Untersuchungen über die Wirkung von Aneurin und Biotin auf das Wachstum von Wurzelpilzen.

Von

Elias Melin und Birgitta Nyman.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 16. Juli 1940.)

In einer früheren Mitteilung (*Melin* und *Lindeberg*, 1939) wurde nachgewiesen, daß Aneurin (Vitamin B_1) in synthetischer Nährlösung eine kräftig stimulierende Wirkung auf das Wachstum folgender Mykorrhizenpilze ausübt: *Boletus elegans (Schum.) Fr.*, *Clitopilus Prunulus (Scop.) Fr.*, *Lactarius deliciosus (L.) Fr.*, *Rhizopogon roseolus (Corda) Th. Fr.*, *Tricholoma imbricatum Fr.* und *T. pessundatum Fr.* Biotin allein hatte keinen stimulierenden Einfluß auf die untersuchten Mykorrhizenpilze. Dagegen hatte diese Substanz zusammen mit Aneurin eine günstige Wirkung auf das Wachstum von *Rhizopogon roseolus*.

Im folgenden werden die Ergebnisse fortgesetzter Versuche mit *Clitopilus Prunulus* und *Lactarius deliciosus* mitgeteilt. Außerdem wurden folgende *Boletus*-Arten untersucht: *B. granulatus (L.) Fr.*, *B. luteus (L.) Fr.*, *B. variegatus (Sw.) Fr.*, *B. piperatus (Bull.) Fr.* und *B. viscidus (L.) Fr.* Ferner wurde eine Reihe Versuche mit *Cenococcum graniforme (Sow.) Ferd. & Winge* ausgeführt, dessen systematische Stellung noch unbekannt ist (*Ferdinandsen* und *Winge*, 1925).

Von den genannten *Boletus*-Arten sind *B. granulatus*, *B. luteus* und *B. variegatus* experimentell als Mykorrhizenbildner bei Nadelbäumen nachgewiesen worden (*Melin*, 1936). Vielleicht sind auch *B. piperatus* und *B. viscidus* Mykorrhizenpilze, wenngleich der experimentelle Beweis hierfür noch nicht erbracht ist (*Melin*, l. c., S. 1033). *Cenococcum graniforme*, der nach *Lihnell* (1939) mit dem von *Hatch* (1934) isolierten *M. R. nigrostrigosum* identisch sein dürfte, ist als Mykorrhizenbildner bei u. a. *Pinus silvestris*, *Picea Abies* und *Betula verrucosa* nachgewiesen worden (*Lihnell*, l. c.).

Die verwendeten Pilzstämme der Hymenomyceten, die in Reinkultur von Gewebestücken junger Fruchtkörper erhalten wurden (*Melin*, 1936), hatten folgendes Alter: *Clitopilus Prunulus* und *Boletus variegatus* 6 Monate, *Lactarius deliciosus* und *B. granulatus* 10 Monate, *B. luteus* 3 Jahre, *B. viscidus* 6 Jahre, *B. piperatus* 8 Jahre. Der *Cenococcum*-Stamm, der uns von Herrn Dr. *D. Lihnell* zur Verfügung gestellt wurde, war 4 Jahre alt.

Die Kulturen wurden in 100-ccm-Erlenmeyerkolben (Jenaer Glas) angelegt. Bei den Versuchen mit suboptimalen Mengen Aneurin wurden 25 ccm Nährlösung benutzt, in den übrigen Fällen 20 ccm. Die verwendeten Impfstämme, die in Petrischalen auf Malzagar gezüchtet wurden (2,5% Malzextrakt + 1,5% Agar-Agar), waren im allgemeinen 10 bis 14 Tage alt. Die Impfung erfolgte in möglichst gleichförmiger Weise nach der von *Fries* (1938) angegebenen Methodik. Die Impfstücke wurden mit großer Vorsicht in die Kolben gebracht, so daß sie schwimmend auf der Flüssigkeitsoberfläche verblieben, wodurch sofort Lufthyphen auswachsen konnten. Dieses Verfahren war notwendig, weil sich die genannten Pilze im allgemeinen äußerst langsam submers entwickeln. Nur *Lactarius deliciosus* wurde submers gezüchtet.

Die Kulturen wurden bei 25° C gehalten. Die Versuchszeit schwankte zwischen 20 und 140 Tagen.

Die angegebenen Wachstumswerte (Myceltrockengewicht) sind im allgemeinen Mittelwerte von 8 Kulturen. Nur bei dem *Cenococcum*-Versuch wurden 6 Parallelkolben angelegt.

Folgende Nährlösungen wurden verwendet:

Nährlösung I (*Fries*, 1938, S. 11):

Glykose	20 g	$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	0,5 g
NH_4-Tartrat	5 g	$FeCl_3$ (1%ige Lösung)	10 Tropfen
KH_2PO_4	0,5 g	Aqua dest.	1000 ccm

p_H (nach Autoklavieren): 5,6.

Nährlösung II (*Melin* und *Lindeberg*, 1939, S. 243):

Glykose	10 g	$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	0,5 g
NH_4-Tartrat	1 g	$FeCl_3$ (1%ige Lösung)	10 Tropfen
KH_2PO_4	0,5 g	Aqua dest.	1000 ccm

p_H (nach Autoklavieren): 5,5.

Bei den Versuchen mit suboptimalen Mengen Aneurin wurde diese Substanz nach dem Autoklavieren zugesetzt. Bei den übrigen Versuchen erfolgte das Autoklavieren (1 Atmosphäre Überdruck) nach dem Zusatz der Wuchsstoffe[1].

Clitopilus Prunulus, Lactarius deliciosus.

Bei früheren Versuchen (*Melin* und *Lindeberg*, 1939) wurden diese beiden Agaricineen in synthetischer Nährlösung mit Aneurin und Hefeextrakt gezüchtet. Was *Clitopilus Prunulus* betrifft, übte Aneurin eine ebenso starke stimulierende Wirkung auf die Wachstumsgeschwindigkeit aus wie Hefeextrakt. Dagegen entwickelte sich *Lactarius deliciosus* mit Hefeextrakt rascher als mit Aneurin. Aus den angestellten Versuchen ging indes nicht hervor, ob ein Aneurinzusatz für das Wachstum in synthetischer Nährlösung nötig ist oder nicht. Um diese Frage näher zu untersuchen, wurden mit *Clitopilus Prunulus* folgende Kulturversuche in Nährlösung I mit einer suboptimalen Menge Aneurin gemacht.

Der Versuch I umfaßte 224 (28 × 8) Kolben, von denen 72 (9 × 8) Kontrollen ohne Aneurinzusatz waren (*a*). Zu 80 (10 × 8) Kolben (*b*) wurden

[1] Das Aneurin stammte von der Firma *Merck*, Darmstadt. Das Biotinpräparat (Biotinmethylester) wurde aus dem Laboratorium von Prof. Dr. *F. Kögl* in Utrecht erhalten.

10 mγ und zu 72 (9 × 8) 20 mγ Aneurin je Kolben (*c*) zugesetzt. Von den *b*-Kolben wurden 8 Stück nach 70 Tagen weiterhin mit je 1 γ Aneurin beschickt.

Die in Tabelle I und Abb. 1 dargestellten Ergebnisse zeigen folgendes: Ohne Aneurin wurde ein maximales Mycelgewicht von nur

Tabelle I. Das Wachstum von *Clitopilus Prunulus (Scop.) Fr.* in Nährlösung I mit 10 und 20 mγ Aneurin.
Kontrollen ohne Aneurin: 0,2 mg (nach 50 Tagen).

Versuchszeit in Tagen	10 mγ Aneurin bei Beginn des Versuches (*b*-Reihe)		20 mγ Aneurin bei Beginn des Versuches (*c*-Reihe)	
	Trockengewicht mg	p_H	Trockengewicht mg	p_H
10	3,8	5,3	3,5	5,3
15	6,3	5,1	7,2	5,1
20	7,3	4,9	9,6	4,9
30	8,7	4,8	—	—
40	9,7	4,7	11,2	4.7
50	10,0	4,6	12,9	4,5
70	5,4	5,0	15,6	4,6
90	4,7	5,0	16,0	4,6
110	4,9	4,9	14,4	4,5
70 + 20 *	69,7	3,8		

* Nach 70 Tagen wurden zu 8 Kolben (10 mγ bei Beginn des Versuches) je 1 γ Aneurin zugesetzt.

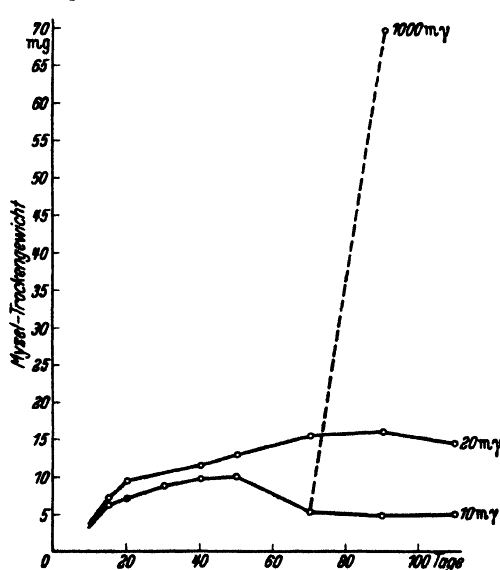


Abb. 1. Das Wachstum von *Clitopilus Prunulus* in Nährlösung I mit 10 mγ und 20 mγ Aneurin. Nach 70 Tagen wurden einer Serie des *b*-Versuches (10 mγ) 1000 mγ Aneurin je Kolben zugesetzt (die gestrichelte Linie).

0,2 mg erzielt, welche Quantität der mit den Impfstücken zugeführten Aneurinmenge entsprechen dürfte. Bei dem *b*-Versuch (10 mγ Aneurin) betrug das Mycelgewicht nach 50 Tagen 10 mg, worauf eine kräftige Autolyse mit Gewichtsabnahme eintrat. Nach 90 Tagen betrug das Mycelgewicht nur 4,7 mg. Daß die Autolyse durch Aneurinmangel hervorgerufen wurde, ging daraus hervor, daß ein Zusatz von Aneurin im Überschuß nach 70 Tagen eine enorme Wachstumssteigerung herbei führte, nämlich von 5,4 mg auf 69,7 mg.

Die Wachstumskurve des *c*-Versuchs (20 mγ) hatte

einen gleichartigen Verlauf, doch hörte das Wachstum erst nach 90 Tagen auf, als ein Mycelgewicht von 16 mg erreicht war. Danach verlangsamte sich das Wachstum.

Die bei dem *b*-Versuch erhaltene Wachstumskurve hat im wesentlichen denselben Verlauf wie die Wachstumskurven für *Polyporus annosus* mit suboptimalen Mengen Aneurin (*Fries*, 1938, S. 106). Hinsichtlich des Aneurinbedarfs in synthetischer Nährlösung gehört *Clitopilus Prunulus* ohne Zweifel zu der gleichen Gruppe wie die letztgenannte Art und dürfte sich als absolut aneurinbedürftig charakterisieren lassen (*Fries*, l. c., S. 158).

Der M/A-Quotient[1] (*Fries*, 1938, S. 76) betrug bei den Versuchen etwa 1 Million, d. h. er war von der gleichen Größenordnung die *Fries* (l. c., S. 166) im allgemeinen bei aneurinbedürftigen Pilzarten gefunden hat.

Bei dem Versuch 2 mit *Lactarius deliciosus* wurden zwei Stämme verwendet, von denen der eine (*K*) aus Kiefernwald, der andere (*F*) aus Fichtenwald stammte. Die Wirkung von Aneurin, Biotin und Inosit wurde in Nährlösung II untersucht. Da das Wachstum sehr langsam vonstatten ging, beanspruchte der Versuch 120 Tage. Die Ergebnisse sind in Tabelle II zusammengestellt.

Tabelle II. Einfluß von Aneurin, Biotin und Inosit auf das Wachstum von *Lactarius deliciosus (L.) Fr.*
Nährlösung II. Versuchszeit 120 Tage.

Stamm	Zusatz je Kolben	Trockengewicht mg	p_H am Ende des Versuches
K	Kontrolle	0,5 ± 0,0	5,0
	1 γ Aneurin	1,6 ± 0,1	4,8
	0,01 γ Biotin	0,5 ± 0,0	5,0
	1 mg Inosit	0,5 ± 0,0	5,1
	1 γ Aueurin + 0,01 γ Biotin	2,1 ± 0,1	4,9
	1 γ Aneurin + 1 mg Inosit	2,2 ± 0,1	4,8
	0,01 γ Biotin + 1 mg Inosit	0,5 ± 0,0	5,0
	1 γ Aneurin + 0,01 γ Biotin + 1 mg Inosit	1,9 ± 0,0	4,8
F	Kontrolle	0,4 ± 0,0	5,1
	1 γ Aneurin	4,2 ± 0,2	5,0
	0,01 γ Biotin	0,4 ± 0,0	5,1
	1 mg Inosit	0,4 ± 0,0	5,1
	1 γ Aneurin + 0,01 γ Biotin	4,5 ± 0,1	4,9
	1 γ Aneurin + 1 mg Inosit	4,4 ± 0,2	5,0
	0,01 γ Biotin + 1 mg Inosit	0,4 ± 0,0	5,0
	1 γ Aneurin + 0,01 γ Biotin + 1 mg Inosit	4,6 ± 0,2	4,9

Es ergibt sich, daß Aneurin eine stimulierende Wirkung auf das Wachstum der beiden benutzten Stämme hatte (vgl. *Melin* und

[1] = Mycel-Aneurin-Quotient.

Lindeberg, 1939). Dagegen verursachten Biotin und Inosit keine Wachstumssteigerung.

Ob Aneurin für diese Art ein notwendiger Wuchsstoff ist oder nicht, muß einstweilen dahingestellt bleiben. Das Wachstum war äußerst langsam, was einer noch unbekannten Mangelerscheinung zuzuschreiben sein dürfte.

Boletus luteus, B. variegatus.

In einem orientierenden Versuch (3) wurde der Aneurineffekt im Vergleich mit der Wirkung von Hefeextrakt (Marmit) untersucht. Der Versuch umfaßte 24 Kolben (Nährlösung I), von denen 8 je 1 γ Aneurin und 8 je 1 mg Marmit erhielten. Die Versuchszeit betrug 20 Tage. Das Ergebnis ist in Tabelle III zusammengestellt.

Tabelle III. Einfluß von Aneurin und Marmit auf das Wachstum von *Boletus luteus (L.) Fr.* und *B. variegatus (Sw.) Fr.* Nährlösung I. Versuchszeit 20 Tage.

	Kontrolle ohne Zusatz		1 γ Aneurin je Kolben		1 mg Marmit je Kolben	
	Trockengewicht mg	p_H am Ende des Versuches	Trockengewicht mg	p_H am Ende des Versuches	Trockengewicht mg	p_H am Ende des Versuches
Boletus luteus ...	2,1 ± 0,2	4,8	31,4 ± 2,0	4,4	32,5 ± 1,9	4,1
„ *variegatus*	2,5 ± 0,2	4,8	62,3 ± 1,9	3,8	50,3 ± 1,6	4,3

Ohne Aneurin war das Wachstum unbedeutend. Bei Zusatz von Aneurin oder Marmit dagegen zeigten beide Arten ein bedeutend rascheres Wachstum. *Boletus variegatus* entwickelte sich besser mit Aneurin als mit Marmit, während *B. luteus* in beiden Fällen ungefähr dasselbe Mycelgewicht erreichte.

Hierauf wurden folgende zwei Versuchsserien (Nährlösung I) ausgeführt, bei denen Aneurin in suboptimaler Menge zugeführt wurde (*Fries*, 1938).

Der Versuch 4 mit *Boletus luteus* umfaßte 232 (29 × 8) Kolben. Von diesen waren 72 (9 × 8) Kontrollen ohne Aneurinzusatz (*a*). Zu 88 (11 × 8) Kolben (*b*) wurden je 10 mγ und zu 72 (9 × 8) Kolben (*c*) je 20 mγ Aneurin zugesetzt. Nach 120 Tagen erhielten 8 *b*-Kolben weiterhin je 10 ccm Nährlösung I und 8 *b*-Kolben je 1 γ Aneurin.

Der Versuch 5 mit *B. variegatus* umfaßte 208 (26 × 8) Kolben, von denen 64 (8 × 8) Kontrollen ohne Aneurin (*a*) waren. In 64 (8 × 8) Kolben (*b*) wurden je 10 mγ Aneurin und in 80 (10 × 8) je 20 mγ gegeben (*c*). Nachdem das Wachstum in den *c*-Kolben nach 40 Tagen sein Maximum erreicht hatte, wurde zu 16 Kolben je 1 γ Aneurin zugesetzt. Gleichzeitig erhielten sämtliche Kolben je 10 ccm Nährlösung.

Die Ergebnisse der Versuche 4 und 5 sind aus Tabelle IV und V sowie Abb. 2 und 3 ersichtlich.

Tabelle IV. Das Wachstum von *Boletus luteus (L.) Fr.* in Nährlösung I mit 10 und 20 mγ Aneurin.

Versuchszeit in Tagen	Ohne Aneurin		10 mγ je Kolben bei Beginn des Versuches		20 mγ je Kolben bei Beginn des Versuches	
	Trockengewicht mg	p_H	Trockengewicht mg	p_H	Trockengewicht mg	p_H
10	0,4	5,3	7,7	4,7	11,3	4,7
15	0,5	5,1	17,7	4,5	24,3	4,3
20	0,8	5,0	25,4	4,4	29,5	4,1
25	1,6	4,9	31,3	4,1	42,3	4,0
30	1,9	4,7	43,7	4,0	62,7	3,7
60	1,4	4,7	59,8	4,3	66,5	4,0
90	1,6	4,5	62,4	4,2	82,0	3,8
120	2,3	4,5	66,4	4,0	92,2	3,7
140	2,7	4,5	64,3	3,7	96,4	3,6
120 + 20 *			66,7	4,0		
120 + 20 **			123,0	3,2		

* Nach 120 Tagen wurden zu 8 Kolben (10 mγ bei Beginn des Versuches) je 10 ccm Nährlösung I zugesetzt. — ** Nach 120 Tagen wurden zu 8 Kolben (10 mγ bei Beginn des Versuches) je 1 γ Aneurin zugesetzt.

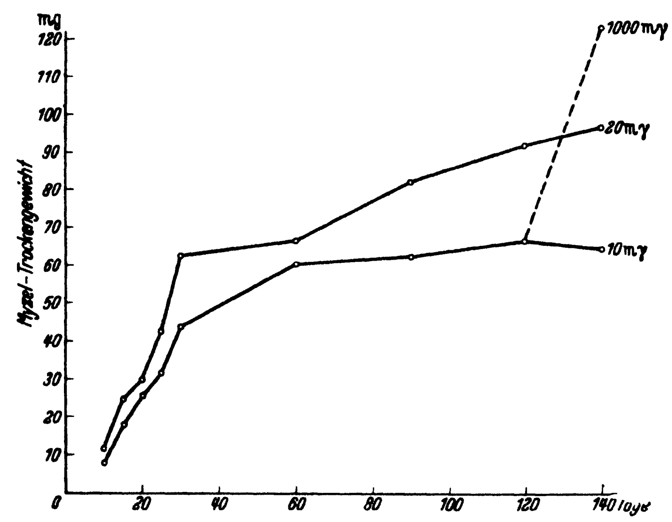


Abb. 2. Das Wachstum von *Boletus luteus* in Nährlösung I mit 10 mγ und 20 mγ Aneurin. Nach 120 Tagen wurden einer Serie des *b*-Versuches (10 mγ) 1000 mγ Aneurin je Kolben zugesetzt (die gestrichelte Linie).

Boletus luteus erreichte in den Kontrollen ohne Aneurin nach 140 Tagen ein Mycelgewicht von 2,7 mg. Es ist bemerkenswert, daß das Wachstum zu dieser Zeit noch nicht völlig zum Stillstand gekommen war. In dem *b*- und *c*-Versuch mit 10 bzw. 20 mγ Aneurin erfolgte eine rasche Entwicklung während der ersten 30 Tage, worauf die Wachstums-

geschwindigkeit sukzessiv abnahm. Bei dem *b*-Versuch hörte das Wachstum nach 4 Monaten auf, als das Mycelgewicht 66,4 mg betrug. Die Ursache für das Aufhören des Wachstums war zweifellos Aneurinmangel. Eine erneute Aneurinzufuhr zu dem genannten Zeitpunkt bewirkte nämlich eine kräftige Wachstumssteigerung: binnen 20 Tagen nahm das Mycelgewicht von 66,4 mg auf 123 mg zu.

Bei dem *c*-Versuch (20 mγ Aneurin) betrug das Mycelgewicht nach 120 Tagen 92,2 mg. Hierauf schritt das Wachstum sehr langsam fort, und während der nächstfolgenden 20 Tage nahm das Mycelgewicht nur um 4,2 mg zu. Wenn der Versuch noch länger fortgesetzt worden wäre, dürfte das Wachstum bald völlig zum Stillstand gekommen sein. Der Verlauf der Wachstumskurven in dem *b*- und *c*-Versuch scheint darauf hinzudeuten, daß der Pilz nicht imstande war, selbst Aneurin zu bilden. Hinsichtlich des Aneurinbedarfs dürfte er deshalb zu derselben Pilzgruppe gehören wie *Clitopilus Prunulus*. Bemerkenswert ist indes, daß der M/A-Quotient sehr hoch war, nämlich 4,7 bis 6,4 Millionen.

Boletus variegatus erreichte bei dem *a*-Versuch ohne Aneurin binnen 40 bis 50 Tagen ein Mycelgewicht von 4,7 mg, worauf Autolyse eintrat. Nach 110 Tagen betrug das Mycelgewicht nur 2,8 mg. Bei dem *b*-Versuch (10 mγ Aneurin) wurde maximales Mycelgewicht (24,6 mg) nach 40 Tagen erzielt, worauf Autolyse erfolgte. Bei dem *c*-Versuch (20 mγ Aneurin) wurde maximales Mycelgewicht (57,9 mg) nach 30 Tagen erhalten, worauf das Wachstum aufhörte und Autolyse einsetzte. Der Aneurinzusatz nach 40 Tagen hob die Autolyse auf und bewirkte eine

Tabelle V. Das Wachstum von *Boletus variegatus (Sw.) Fr.* in Nährlösung I mit 10 und 20 mγ Aneurin.

Versuchszeit in Tagen	Ohne Aneurin		10 mγ je Kolben bei Beginn des Versuches		20 mγ je Kolben bei Beginn des Versuches	
	Trockengewicht mg	p_H	Trockengewicht mg	p_H	Trockengewicht mg	p_H
10	1,0	5,2	4,2	5,0	7,8	4,9
15	1,8	5,1	9,2	4,7	16,6	4,6
20	2,9	5,0	18,2	4,5	33,0	4,4
30	3,7	4,9	22,9	4,2	57,9	4,0
40	4,7	4,9	24,6	4,2	54,9	4,0
50	4,7	4,9	20,9	4,5	47,7	4,5
70	—	—	19,1	4,4	43,5	4,3
80	3,8	4,9	—	—	—	—
90	—	—	20,0	4,4	50,6	4,2
110	2,8	4,9	—	—	—	—
40 + 30*					104,6	4,0
40 + 50*					156,2	3,9

* Nach 40 Tagen wurden zu 16 Kolben (20 mγ bei Beginn des Versuches) je 1 γ Aneurin zugesetzt.

ungemein kräftige Wachstumssteigerung. Der Verlauf der Wachstumskurven in dem *b*- und *c*-Versuch spricht dafür, daß die Art in synthetischer Nährlösung absolut aneurinbedürftig ist.

Der M/A-Quotient betrug 2,0 bis 2,7 Millionen. In dieser Beziehung nimmt die Art eine Mittelstellung zwischen *Clitopilus Prunulus* und *Boletus luteus* ein.

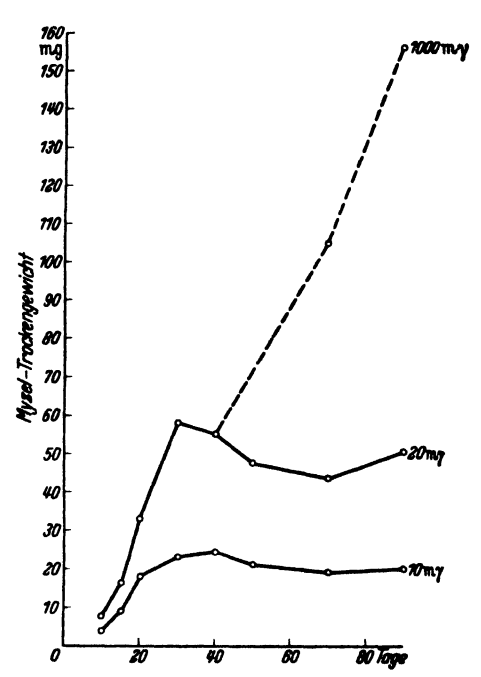


Abb. 3. Das Wachstum von *Boletus variegatus* in Nährlösung I mit 10 mγ und 20 mγ Aneurin. Nach 40 Tagen wurden einer Serie des *c*-Versuches (20 mγ) 1000 mγ Aneurin je Kolben zugesetzt (die gestrichelte Linie).

Boletus granulatus, *B. piperatus*, *B. viscidus*.

Mit diesen Arten wurden einstweilen nur orientierende Versuche ausgeführt, wobei der Einfluß von Aneurin, Biotin und Inosit untersucht wurde. Als Substrat diente Nährlösung II.

Die Ergebnisse von zwei Versuchen mit *B. granulatus* sind in Tabelle VI und VII zusammengestellt. Die beiden Versuche wurden zu verschiedenen Zeitpunkten ausgeführt. Von besonderem Interesse ist, daß sich dieser Pilz verhältnismäßig kräftig auch in den Kontrollkolben ohne Wuchsstoff entwickelte. In Versuch 6 (Tabelle VI) hatten sich 11,8 mg binnen 35 Tagen und in Versuch 7 (Tabelle VII) binnen 25 Tagen 9,9 mg gebildet. Dieses hohe Mycelgewicht deutet auf Fähigkeit zu Aneurinsynthese. Andererseits bewirkte indes ein Aneurinzusatz eine überaus starke Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit. Dagegen hatten Biotin und Inosit keinen Einfluß.

Tabelle VI. Einfluß von Aneurin, Biotin und Inosit auf das Wachstum von *Boletus granulatus (L.) Fr.*

Nährlösung II. Versuchszeit 35 Tage.

Zusatz je Kolben	Trockengewicht mg	p_H am Ende des Versuches
Kontrolle	11,8 ± 0,8	4,3
1 γ Aneurin	40,9 ± 0,9	3,7

Tabelle VII. Einfluß von Aneurin, Biotin und Inosit auf das Wachstum von *Boletus granulatus (L.) Fr.*
Nährlösung II. Versuchszeit 25 Tage.

Zusatz je Kolben	Trockengewicht mg	p_H am Ende des Versuches
Kontrolle	9,9 ± 0,3	4,1
1 γ Aneurin	22,7 ± 0,9	4,0
0,01 γ Biotin	9,6 ± 0,5	4,4
0,005 γ „	8,4 ± 0,5	4,3
0,0025 γ „	8,9 ± 0,5	4,3
0,001 γ „	9,7 ± 0,6	4,3
0,0005 γ „	8,1 ± 0,5	4,5
1 mg Inosit	8,5 ± 0,4	4,2
1 γ Aneurin + 0,01 γ Biotin	25,2 ± 0.8	3,8
1 γ „ + 0,005 γ „	23,9 ± 0,8	3,8
1 γ „ + 0,0025 γ „	25,5 ± 1	3,8
1 γ „ + 0,001 γ „	25,1 ± 0,9	3,8
1 γ „ + 0,0005 γ „	24,8 ± 1	3,9
1 γ Aneurin + 1 mg Inosit	26,1 ± 1	3,8
0,01 γ Biotin + 1 „ „	11,1 ± 0,6	4,2
0,005 γ „ + 1 „ „	10,9 ± 0,4	4,3
0,0025 γ „ + 1 „ „	10,5 ± 0,7	4,2
0,001 γ „ + 1 „ „	10,3 ± 0,6	4,2
0,0005 γ „ + 1 „ „	9,6 ± 0,5	4,3
1 γ Aneurin + 0.01 γ Biotin + 1 mg Inosit	23,8 ± 1	3,8
1 γ „ + 0,005 γ „ + 1 „ „	24,5 ± 0,9	3,8
1 γ „ + 0,0025 γ „ + 1 „ „	25,9 ± 1	3,9
1 γ „ + 0,001 γ „ + 1 „ „	27,3 ± 1	3,8
1 γ „ + 0,0005 γ „ + 1 „ „	24,0 ± 0,6	3,8

Bei dem Versuch 8 mit *B. piperatus* bildeten sich in den Kontrollkolben ohne Aneurin 2,5 mg Mycel binnen 20 Tagen (Tabelle VIII). Bei Aneurinzusatz betrug die Mycelmenge 16,0 mg. Es ist bemerkenswert, daß Biotin allein die Wachstumsgeschwindigkeit deutlich steigerte, während Aneurin und Biotin zusammen einen geringeren Ertrag lieferten als Aneurin allein. Zusammen mit Aneurin (1 γ) scheint also Biotin hemmend auf die Wachstumsgeschwindigkeit gewirkt zu haben. Die

Tabelle VIII. Einfluß von Aneurin, Biotin und Inosit auf das Wachstum von *Boletus piperatus (Bull.) Fr.*
Nährlösung II. Versuchszeit 20 Tage.

Zusatz je Kolben	Trockengewicht mg	p_H am Ende des Versuches
Kontrolle	2,5 ± 0,2	4,7
1 γ Aneurin	16,0 ± 0,6	4,0
0,01 γ Biotin	5,3 ± 0,2	4,6
1 mg Inosit	2,7 ± 0,0	4,7
1 γ Aneurin + 0,01 γ Biotin	8,8 ± 0,3	4,4
1 γ „ + 1 mg Inosit	16,3 ± 1,2	3,9
0,01 γ Biotin + 1 „ „	2,1 ± 0,7	4,9
1 γ Aneurin + 0,01 γ Biotin + 1 mg Inosit	8,1 ± 0,9	4,5

Tabelle IX. Einfluß von Aneurin, Biotin und Inosit auf das Wachstum von *Boletus viscidus (L.) Fr.*

Nährlösung II. Versuchszeit 30 Tage.

Zusatz je Kolben	Trockengewicht mg	p_H am Ende des Versuches
Kontrolle	1,1 ± 0,0	4,5
1 γ Aneurin	6,5 ± 0,3	4,4
0,01 γ Biotin	1,4 ± 0,2	4,5
1 mg Inosit	1,5 ± 0,2	4,5
1 γ Aneurin + 0,01 γ Biotin	6,5 ± 0,4	4,2
1 γ „ + 1 mg Inosit	6,4 ± 0,4	4,4
0,01 γ Biotin + 1 „ „	1,1 ± 0,0	4,5
1 γ Aneurin + 0,01 γ Biotin + 1 mg Inosit	6,9 ± 0,4	4,1

Ursache hiervon muß einstweilen dahingestellt bleiben. Der Umstand, daß Biotin allein das Wachstum beschleunigt hat, spricht indes dafür, daß eine Aneurinsynthese stattgefunden hat.

Der verwendete Stamm von *B. viscidus* (Versuch 9) entwickelte sich langsam (Tabelle IX), was teilweise darauf beruhte, daß er 6 Jahre in Kultur gehalten worden war. Die Wachstumsgeschwindigkeit wurde durch Aneurin erheblich gesteigert, nicht dagegen durch Zusatz von Biotin und Inosit.

Cenococcum graniforme.

Bei dem Versuch mit dieser Art wurde Nährlösung II benutzt, der Aneurin, Biotin und Inosit in verschiedenen Kombinationen zugesetzt wurden, wie aus Tabelle X ersichtlich ist (Versuch 10). Auch bei diesem Versuch rief Aneurin eine starke Steigerung der Wachstumsgeschwindigkeit hervor. Von Interesse ist, daß auch Biotin — sowohl allein als in Kombination mit Inosit — einen stimulierenden Einfluß auf die Wachstumsgeschwindigkeit ausübte. Hieraus scheint man den Schluß ziehen zu können, daß die Fähigkeit zu Biotinsynthese in den Kontrollen ohne Aneurin unzureichend war, während der Pilz nach Aneurinzusatz die Fähigkeit hatte, selbst Biotin in genügender Menge

Tabelle X. Einfluß von Aneurin, Biotin und Inosit auf das Wachstum von *Cenococcum graniforme (Sow.) Ferd. & Winge.*

Nährlösung II. Versuchszeit 25 Tage.

Zusatz je Kolben	Trockengewicht mg	p_H am Ende des Versuches
Kontrolle	2,7 ± 0,7	4,7
1 γ Aneurin	15,1 ± 1,3	4,4
0,02 γ Biotin	8,8 ± 1,1	4,7
1 mg Inosit	3,0 ± 0,6	4,7
1 γ Aneurin + 0,02 γ Biotin	17,3 ± 1,5	4,5
1 γ „ + 1 mg Inosit	15,4 ± 1,1	4,5
0,02 γ Biotin + 1 „ „	8,3 ± 0,6	4,4
1 γ Aneurin + 0,02 γ Biotin + 1 mg Inosit	15,3 ± 1,5	4,4

zu bilden. Andererseits scheint der Umstand, daß Biotin allein die Wachstumsgeschwindigkeit erhöhte, darauf hinzudeuten, daß bei Anwesenheit von Biotin eine gewisse Fähigkeit zu Aneurinsynthese bestand. *Cenococcum graniforme* scheint deshalb — wenigstens unter gewissen Verhältnissen — imstande zu sein, ohne Aneurinzusatz zu wachsen. Fortgesetzte Untersuchungen dürften ergeben, ob dieser Schluß richtig ist oder nicht.

Zusammenfassung.

1. Die vorliegende Untersuchung behandelt in erster Linie den Einfluß von Aneurin in suboptimalen Mengen auf das Wachstum von *Clitopilus Prunulus (Scop.) Fr.*, *Boletus luteus (L.) Fr.* und *B. variegatus (Sw.) Fr.*

2. Aneurin hatte bei diesen Pilzen eine überaus starke stimulierende Wirkung auf die Wachstumsgeschwindigkeit.

3. Der Verlauf der Wachstumskurven scheint darauf hinzudeuten, daß die Pilze bei diesen Versuchen nicht die Fähigkeit besaßen, selbst Aneurin zu synthetisieren. Die genannten Arten dürften der Gruppe von Pilzen angehören, die *Fries* (1938) als absolut aneurinbedürftig bezeichnet hat.

4. Außerdem wurden *Lactarius deliciosus (L.) Fr.*, *Boletus granulatus (L.) Fr.*, *B. piperatus (Bull.) Fr.*, *B. viscidus (L.) Fr.* und *Cenococcum graniforme (Sow.) Ferd. & Winge* untersucht.

5. Aneurin hatte in sämtlichen Fällen einen stark beschleunigenden Einfluß auf das Wachstum. Biotin wirkte stimulierend auf das Wachstum von *Boletus piperatus* und *Cenococcum graniforme*, hatte dagegen keinen Einfluß auf die übrigen Arten.

6. *Boletus granulatus*, *B. piperatus* und *Cenococcum graniforme* scheinen die Fähigkeit zu besitzen, selbst Aneurin zu synthetisieren. Fortgesetzte Untersuchungen mit diesen Arten sind im Gange.

7. Es ist von großem Interesse, daß die Mykorrhizenpilze der Bäume hinsichtlich ihrer Forderungen in bezug auf Wuchsstoffe physiologisch nicht gleichwertig sind.

Literatur.

Ferdinandsen, C., u. *Ø. Winge*, Kgl. Veterinaer- og Landbohøjskole Aarskrift **1925**, S. 332. — *Fries, N.*, Über die Bedeutung von Wuchsstoffen für das Wachstum verschiedener Pilze. Symb. Bot. Ups. III: 2, Upsala 1938. — *Hatch, A. B.*, Svensk. Bot. Tidskr. **28**, 369, 1934. — *Lihnell, D.*, Untersuchungen über die Mykorrhizen und die Wurzelpilze von *Juniperus communis*. Symb. Bot. Ups. III: 3, Upsala 1939. — *Melin, E.*, Methoden der experimentellen Untersuchung mykotropher Pflanzen. Handb. biol. Arbeitsmethod., Abt. XI, 4, 1015, 1936. — *Melin, E.*, u. *G. Lindeberg*, Bot. Notiser **1939**, S. 241. — *Modess, O.*, Svensk. Bot. Tidskr. **33**, 91, 1939.

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.)

Untersuchungen über die antagonistische Wirkung von Magnesium gegenüber Bor und Quecksilber bei einigen Pilzen.*

Von

Werner Lohrmann.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 14. September 1940.)

Die Versuche, über die im folgenden berichtet werden wird, stellen eine Fortsetzung der früher von *A. Rippel* und *Stoess* sowie von *Lohmann* angestellten Untersuchungen dar. Danach hatte sich ergeben, daß bei Mikroorganismen Calcium als ein starker Antagonist gegen durch hohe Gaben von Magnesiumsulfat bewirkte Schädigungen wirksam sein und in dieser Hinsicht nicht nur durch Strontium, sondern auch durch Tannin ersetzt werden kann. Es war zu erwarten, daß man noch weitere Stoffe als in gleicher Weise antagonistisch wirksam finden könne. Da Magnesiumsulfat, ganz allgemein gesehen, auflockernd auf die Plasmakolloide wirken wird, so war nach Stoffen von entgegengesetzter, verdichtender bzw. gerbender Wirkung zu suchen. Daher wurden Versuche mit Sublimat und Borsäure als Antagonisten durchgeführt bei hohen Gaben von Magnesiumsulfat. Es konnte gleichzeitig erwartet werden, daß sich auf diese Weise auch einige Gesichtspunkte zur Frage der schon von *Lohmann* erörterten Nährstoffwirkung bzw. Giftwirkung ergeben würden. Über einige allgemeine Gesichtspunkte, die sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Versuche in dieser Hinsicht ergeben, wurde bereits an anderer Stelle von *A. Rippel* und *Lohrmann* berichtet.

Versuchsanstellung.

In Vorversuchen, die in den folgend mitgeteilten Ergebnissen nur teilweise erscheinen, mußte zunächst für jeden der verwendeten Pilze, deren Zugehörigkeit aus Tabelle XVII, S. 355, hervorgeht, die geeignete Nährlösung gefunden und vor allem festgestellt werden, bei welcher Konzentration von Magnesiumsulfat bzw. Sublimat oder Borsäure die Schädigungsgrenze liegt, da natürlich nur von dieser aus die weiteren Versuche durchgeführt werden konnten. Auf weitere als die später mitgeteilten Einzelheiten braucht hier indessen nicht eingegangen zu werden.

* D 7.

Die Versuche wurden mit je 25 ccm Nährlösung in 100er *Erlenmeyer*-Kölbchen aus Jenaer 20er Glas angestellt, die vor jeder Verwendung mit Chromschwefelsäure, darauf mit Leitungswasser und anschließend mit dest. Wasser gereinigt wurden. Wie sich die Abgabe der verwendeten Stoffe aus dem Glase gestaltete, wurde in Hinsicht auf das Bor untersucht; diese Versuche sind S. 335f mitgeteilt.

Die Kölbchen waren im Brutzimmer bei 25 bis 28° C aufgestellt, nur bei den S. 347 mitgeteilten *Penicillium*-Versuchen bei 18 bis 20° C. Die Impfung erfolgte mit einer Öse Sporen von Schrägagar-Würzekulturen. Vor der Ernte wurde die Kultur aufgekocht, um eine zu starke Verseuchung der Institutsräume mit den Sporen zu verhüten. Obwohl hierdurch die Ernte nicht absolut richtig ist, kann doch kein grundsätzlicher Fehler entstanden sein, da es hier ja nur auf Vergleichswerte ankommt. Nach dem Aufkochen wurde quantitativ abfiltriert, das Mycel 24 Stunden bei etwa 30° C im Brutzimmer vorgetrocknet, darauf 1 Stunde bei 100 bis 105° C getrocknet und nach dem Erkalten im Wägegläschen gewogen. Die Erntegewichte sind stets in mg angegeben.

Die Angabe der Bestandteile der Nährlösung bezieht sich auf 100 ccm Nährlösung. Diese enthielt als Stamm- bzw. Kontrollnährlösung stets die übliche Menge von Magnesiumsulfat, hingegen natürlich kein Sublimat und kein Bor als künstlichen Zusatz. Beim Zusatz hoher Gaben von Magnesiumsulfat wurde dieses zur fertigen Stammnährlösung fest als Substanz hinzugewogen, also 1 g auf 25 ccm usw. In den Tabellen ist diese Menge auf 100 ccm Nährlösung angegeben. Diese Zahlen bedeuten also nicht ganz Prozentzahlen in der Nährlösung, da das Flüssigkeitsvolumen durch die Zugabe größerer Salzmengen steigt, der prozentige Gehalt also etwas geringer ist. Für unsere Vergleichszwecke genügt indessen diese Angabe, aus der im Bedarfsfalle jederzeit die wirklichen Prozentzahlen errechnet werden können. Hingegen bedeutet die Normalmenge an Magnesiumsulfat, in den Tabellen mit K (= Kontrolle) bezeichnet, den wirklichen Prozentgehalt.

Die Angaben der Tabellen über den Gehalt an Sublimat und an Borsäure bzw. Borax bedeuten jedoch Prozentzahlen. Hinsichtlich der Herstellung der borhaltigen Nährlösungen sei im übrigen auf S. 338 verwiesen. Weitere Einzelheiten werden ebenfalls an gegebener Stelle mitgeteilt.

Hinsichtlich der Tabellen sei noch folgendes bemerkt: (K) hinter der Normalgabe $MgSO_4$ bedeutet, wie gesagt, den prozentigen Normalgehalt daran. M. S. bedeutet mittlere Schwankung, berechnet aus der Formel $\sqrt{\frac{\text{Summe der (Abweichungen)}^2}{\text{Anzahl der Parallelen}}}$. Die Anzahl der Parallelen ist in Klammern hinter der M. S. angegeben. Hierbei ist allerdings die Berechnung bei nur zwei Parallelen sinnlos, kann aber für die Vergleichszwecke einen gewissen Anhalt für die Größe der Schwankung bieten.

Die Zahlen für das Erntegewicht sind der besseren Übersichtlichkeit halber kursiv gesetzt. Durch Fettdruck sind zudem die Zahlen der Kontrolle hervorgehoben sowie die Zahlen, aus denen der Antagonismus besonders deutlich ersichtlich ist. Ferner ist unter den Tabellen jeweils die Zeit der Kulturdauer in Tagen angegeben.

In den Tabellen mußten *alle* Versuche aufgenommen werden, da diese auch mit dem gleichen Pilz sehr verschiedenartig ausfielen.

Antagonismus von Magnesiumsulfat und Sublimat.

Aspergillus niger (Tabelle I).

Wirkung von Magnesiumsulfat und Sublimat: Die Magnesiumsulfatschädigung ist in den vier Versuchen der Tabelle I verschieden ausgefallen: Während 20 und 32 g $MgSO_4$ in Versuch 1 bis 3 einen starken Anstieg über den Ertrag der Normalgabe zeigen, schädigen bei Versuch 4 bereits 20 g $MgSO_4$ schwach, 32 g stark. Auch Sublimat zeigt Unregelmäßigkeiten. Bei Versuch 1 (unsicher bei Versuch 2) offenbar geringe Förderung bis 2,5 mg% $HgCl_2$, bei 5 mg% Schädigung in Versuche 1 und 2, während diese Gabe in Versuch 4 nicht schädigt, im Vergleich zu den niedrigeren, jedoch alle $HgCl_2$-Ertragswerte unter der Kontrolle liegen; dieser Versuch verhält sich ja auch hinsichtlich des Magnesiumsulfats abweichend. 10 mg% Sublimat schädigen in jedem Falle, wenn auch in verschieden hohem Grade; der Ertrag gegenüber der Kontrolle beträgt 16, 77, 19 und 24%.

Tabelle I. *Aspergillus niger*. Antagonismus von Magnesiumsulfat und Sublimat.

g $MgSO_4$	mg% $HgCl_2$	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		Versuch 4	
		mg Mycel	M. S.	mg Mycel	M. S.	mg Mycel	M. S.	mg Mycel	M. S.
0,1 (K)	0	***425***	35 (3)	***516***	5 (4)	***618***	12 (3)	***672***	9 (3)
20	0	*532*	61 (3)	*859*	9 (3)	*912*	24 (2)	*601*	61 (2)
32	0	*646*	90 (3)	*833*	54 (3)	*905*	53 (2)	***445***	28 (3)
40	0	—		***508***	51 (4)	—		—	
0,1 (K)	0,1	*414*	6 (2)	—		*608*	5 (2)	*562*	8 (3)
0,1 (K)	0,5	*480*	25 (3)	*563*	19 (4)	*575*	11 (2)	*620*	12 (3)
0,1 (K)	2,5	*535*	29 (3)	*544*	12 (4)	*593*	7 (2)	*570*	19 (4)
0,1 (K)	5,0	*345*	21 (3)	*458*	28 (5)	—		*579*	17 (3)
0,1 (K)	10,0	***68***	33 (3)	***395***	43 (5)	***115***	16 (2)	***161***	79 (3)
20	0,5	*461*	42 (4)	—		—		—	
20	2,5	*506*	64 (3)	—		—		—	
20	10,0	*434*	28 (3)	*725*	38 (4)	—		—	
32	0,5	*642*	92 (3)	—		*718*	24 (3)	*465*	30 (3)
32	2,5	*562*	78 (3)	—		*690*	63 (3)	***602***	131 (3)
32	5,0	*546*	52 (6)	*834*	57 (2)	—		*502*	52 (3)
32	10,0	***512***	33 (3)	***885***	62 (4)	***390***	54 (3)	***544***	128 (3)
40	0,5	—		*624*	73 (4)	—		—	
40	2,5	—		*728*	43 (5)	—		—	
40	5,0	—		***775***	31 (5)	—		—	
40	10,0	—		***712***	54 (5)	—		—	

Kulturdauer: 5, 11, 8 und 7 Tage.
Nährlösung: Wasser dest. 1000; Saccharose 100; KNO_3 10; $MgSO_4$ 1; Na_2HPO_4 2,5; $FeSO_4$ 0,3; $ZnSO_4$ 0,005; $CuSO_4$ 0,0025; p_H 7,3.

Sublimatschädigung, behoben durch Magnesiumsulfat: Die antagonistische Wirkung von 32 $MgSO_4$ ist bei Schädigung durch 10 mg%

Sublimat überall deutlich; die Wirkung stellt sich auf das 7,5- (68 gegen 512 mg Mycel), 2,2- (395 gegen 885 mg Mycel), 3,4- (115 gegen 390 mg Mycel) und 3,4- (161 gegen 544 mg Mycel)-fache bei den einzelnen Versuchen, bei Versuch 2 mit 40 $MgSO_4$ auf das 1,8fache (395 gegen 712 mg Mycel). Wo durch 20 und 32 $MgSO_4$ ohne Sublimat eine Ertragssteigerung eingetreten ist (Versuche 1 bis 3), liegen auch die antagonistischen Werte meist über der Kontrolle; doch werden die mit den $MgSO_4$-Gaben allein erreichten Erträge bei Gegenwart von Sublimat nicht überschritten, wenn auch in vielen Fällen erreicht. Daß eine Sublimat-



Abb. 1. Wirkung von Sublimat auf die Sporenbildung von *Aspergillus niger* nach 7 Tagen Kulturdauer.

Kolben von links nach rechts:

Behandlung g $MgSO_4$ zu 100 ccm	32	32	0,1	0,1	0,1	0.1
mg% $HgCl_2$	2,5	0	0,1	2,5	5,0	0
Sporen	keine	keine	sehr viel	viel	mittel	wenig
mg Pilzmycel	453	402	568	588	592	680

schädigung durch Magnesiumsulfat aufgehoben werden kann, tritt demnach deutlich in Erscheinung.

Magnesiumsulfatschädigung, behoben durch Sublimat: Versuche 2 und 4 zeigen, daß auch eine Schädigung durch Magnesiumsulfat durch Sublimat aufgehoben werden kann; die Erträge steigen bei Versuch 2 für 40 $MgSO_4$ bei 5 mg% Sublimat auf das 1,5fache (508 gegen 775 mg Mycel). Es ist ferner zu erkennen, daß, bis zu einer gewissen Grenze, stärkere Sublimatmengen stärker antagonistisch fördern, wie der Vergleich zwischen 0,5, 2,5 und 5,0 mg% $HgCl_2$ bei Versuch 2 für 40 $MgSO_4$ (624, 728 und 775 mg Ernte) und bei Versuch 4 zwischen 0,5 und 2,5 mg% $HgCl_2$ für 32 $MgSO_4$ (465 und 602 mg Ernte) zeigt[1].

Sehr auffallend ist die Wirkung des Sublimats auf die Sporenbildung von *Aspergillus niger*, die aus Abb. 1 hervorgeht. Hohe $MgSO_4$-

[1] Auch *Waterman* (1) führt einen Versuch an, in dem gleichzeitig Magnesiumsulfat und Sublimat gegeben wurde, jenes allerdings nur in geringen, noch nicht schädlichen Mengen, so daß die Erscheinungen, um die es sich hier handelt, nicht hervortreten konnten.

Gaben unterdrücken die Sporenbildung vollständig; Sublimat vermag sie in diesem Falle nicht mehr hervorzurufen. Was hier vorliegt, kann nicht entschieden werden. Man wird jedoch kaum eine unmittelbare Nährstoffwirkung analog der Wirkung des Kupfers annehmen dürfen, sondern wohl nur eine mittelbare Wirkung. Die am stärksten die Sporenbildung fördernde Menge des Sublimats (0,1 mg%) liegt, wie die unter der Tabelle angegebenen Ertragszahlen zeigen, ebenso wie in den Versuchen der Tabelle I bereits im Gebiet der Ertragsschädigung (vgl. dazu weiter S. 362).

Aspergillus flavus (Tabelle II).

Wirkung von Magnesiumsulfat und Sublimat: Die Schädigungen durch $MgSO_4$ erfolgen (hier im Vergleich zu *Asp. niger*) erst bei noch etwas höheren Konzentrationen; auch hier ist jedoch die Wirkung nicht einheitlich, da die in Versuchen 2 und 4 fördernde Wirkung von 40 $MgSO_4$ in Versuch 3 stark schädigt. $HgCl_2$ zeigt erst von 10 mg% ab eine Schädigung, die Schwelle liegt also ebenfalls höher als bei *niger*:

Tabelle II. *Aspergillus flavus.* Antagonismus von Magnesiumsulfat und Sublimat.

g $MgSO_4$	mg% $HgCl_2$	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		Versuch 4	
		mg Mycel	M. S.	mg Mycel	M. S.	mg Mycel	M. S.	mg Mycel	M. S.
0,05 (K)	0	***548***	10 (3)	***595***	15 (3)	***588***	13 (4)	***646***	31 (3)
40	0	—		*800*	81 (3)	*347*	53 (4)	*955*	3 (3)
48	0	***431***	42 (3)	*434*	52 (4)	*263*	72 (4)	*612*	48 (3)
60	0	*138*	24 (3)	—		***38***	7 (4)	*211*	16 (3)
0,05 (K)	0,05	*541*	8 (3)	—		—		—	
0,05 (K)	0,5	*552*	6 (3)	*597*	6 (3)	*604*	4 (4)	*647*	8 (3)
0,05 (K)	2,5	*546*	7 (3)	—		—		*639*	16 (3)
0,05 (K)	5,0	—		*638*	12 (4)	*620*	3 (4)	*624*	19 (3)
0,05 (K)	10,0	***457***	21 (3)	*228*	42 (4)	*527*	53 (4)	***45***	4 (4)
0,05 (K)	15,0	—		—		—		***0***	0 (4)
40	0,5	—		*543*	35 (3)	*542*	71 (3)	*965*	31 (2)
40	5,0	—		*732*	12 (3)	*408*	37 (3)	*961*	6 (3)
40	10,0	—		*530*	31 (3)	*209*	29 (3)	***810***	14 (3)
40	15,0	—		—		—		*437*	18 (3)
48	0,05	*365*	34 (3)	—		—		—	
48	0,5	*400*	32 (3)	*362*	8 (4)	*418*	9 (3)	*883*	64 (3)
48	2,5	*625*	40 (4)	—		—		*745*	31 (3)
48	5,0	—		*472*	34 (4)	*359*	42 (4)	*712*	42 (4)
48	10,0	***678***	32 (3)	*221*	18 (4)	*243*	38 (4)	***720***	53 (4)
48	15,0	—		—		—		***145***	41 (3)
60	5,0	—		—		***118***	23 (3)	—	
60	10,0	—		—		*86*	16 (3)	—	

Kulturdauer: 7, 7, 6 und 7 Tage.

Nährlösung: Wasser dest. 1000; Saccharose 100; KH_2PO_4 5; $MgSO_4$ 0,5; KNO_3 33,5; NaCl, $MnSO_4$, $FeSO_4$, Citronensäure je 0,01; $ZnSO_4$ 2 Tropfen 1%ige Lösung; $CuSO_4$ 1 Tropfen 1%ige Lösung. p_H 4,5.

Förderung durch geringere Mengen ist hier nirgends zu erkennen. Bei 15 mg% tritt keine Entwicklung mehr ein. Die Schädigungen durch 10 mg% $HgCl_2$ sind quantitativ ebenfalls sehr verschieden; die Ernten betragen der Kontrolle gegenüber 83, 38, 88 und 7%.

Sublimatschädigung, behoben durch Magnesiumsulfat: Die Sublimatschädigungen werden durch hohe $MgSO_4$-Gaben in allen Fällen gemildert, außer in Versuch 3. Versuch 4 ist besonders lehrreich: Mit 10 mg% $HgCl_2$ steigt bei 40 $MgSO_4$ der Ertrag auf das 18fache (45 gegen 810 mg Mycel), während bei 15 mg% $HgCl_2$ ohne hohe $MgSO_4$-Gabe überhaupt kein Ertrag zustande kam, bei 48 $MgSO_4$ jedoch noch 145 mg Ernte erzielt wurden. Es kann also sogar eine absolut hemmende Sublimatdosis durch $MgSO_4$ entgiftet werden.

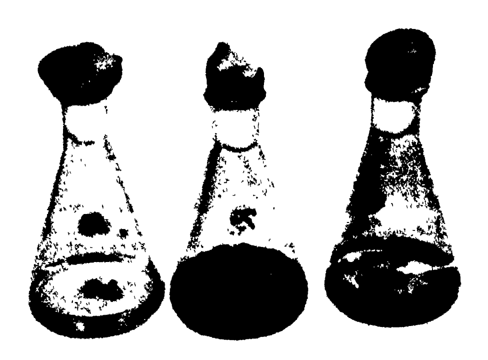


Abb. 2. *Aspergillus flavus*, Antagonismus zwischen Magnesiumsulfat und Sublimat. Kolben von links nach rechts:

Behandlung g $MgSO_4$ zu 100 ccm	0,05	48	48
mg% $HgCl_2$	10	10	0
mg Pilzmycel	41	779	565

Magnesiumsulfatschädigung, behoben durch Sublimat: Auch hier ist der Antagonismus deutlich zu erkennen, liegt aber recht unregelmäßig: In Versuch 1 wird die durch 48 $MgSO_4$ bewirkte Schädigung von 2,5 und von 10 mg% $HgCl_2$ aufgehoben (Steigen auf das 1,5- bzw. 1,6fache; von 431 auf 625 bzw. 679 mg Ernte), in Versuch 2 ist kein Ausgleich zu erkennen, in Versuch 3 erfolgt sie für jede der drei hohen $MgSO_4$-Gaben bei den niedrigeren $HgCl_2$-Konzentrationen; im höchsten Falle (60 $MgSO_4$ und 5 mg% $HgCl_2$) ist der Ertrag auf das 3,1fache (38 gegen 118 mg Mycel) gestiegen. In Versuch 4 werden durch $HgCl_2$ die maximalen Werte ohne $HgCl_2$ erreicht. Auch bei diesem Pilz wirkt Sublimat quantitativ abgestuft.

Den Magnesiumsulfat-Sublimat-Antagonismus bei *Aspergillus flavus* nach Versuch 4 der Tabelle II* zeigt Abb. 2.

* Die Abbildung zeigt nur eine der Parallelen.

Mucor pusillus (Tabelle III).

Wirkung von Magnesiumsulfat und Sublimat: Dieser Pilz ist dadurch charakterisiert, daß er den beiden vorigen gegenüber viel empfindlicher gegen Magnesiumsulfat ist und schon durch die Gabe 4 geschädigt wird; doch verstärkt sich die Schädigung bei 20 $MgSO_4$ nicht so, wie man danach erwarten sollte; man vergleiche hierzu indessen die Ausführungen

Tabelle III. *Mucor pusillus.* Antagonismus von Magnesiumsulfat und Sublimat.

g $MgSO_4$	mg% $HgCl_2$	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		Versuch 4	
		mg Mycel	M. S.	mg Mycel	M. S.	mg Mycel	M. S.	mg Mycel	M. S.
0,1(K)	0	***748***	34 (3)	***916***	18 (2)	***832***	81 (4)	***527***	114 (6)
4	0	*407*	31 (3)	***500***	61 (3)	***402***	12 (4)	***253***	29 (6)
20	0	*286*	17 (2)	*357*	22 (3)	—		·	
0,1 (K)	0,05	*774*	14 (3)	*913*	20 (3)	—		—	
0,1 (K)	0,5	*791*	13 (4)	*831*	36 (3)	*881*	21 (4)	—	
0,1 (K)	5,0	*761*	27 (3)	***834***	14 (3)	*870*	24 (4)	—	
0,1 (K)	10,0	*789*	15 (3)	*868*	17 (4)	—		—	
0,1 (K)	20,0	—		*851*	31 (4)	***813***	42 (4)	*549*	30 (6)
0,1 (K)	40,0	—		—		*381*	21 (4)	***0***	0 (6)
0,1 (K)	60,0	—		—		—		***0***	0 (6)
0,1 (K)	80,0	—		—		—		*0*	0 (6)
0,1 (K)	100,0	—		—		—		*0*	0 (6)
4	0,5	*347*	10 (3)	*998*	51 (4)	*752*	33 (4)	—	
4	5,0	*469*	12 (3)	***1058***	31 (4)	*796*	41 (4)		
4	10,0	*452*	18 (3)	—		—		—	
4	20,0	—		*1046*	27 (4)	***912***	23 (4)	*209*	31 (6)
4	40,0	—		—		*135*	74 (4)	***150***	28 (6)
4	60.0	—		—		—		***60****	43 (6)
4	80,0	—		—		—		*0***	0 (6)
4	100,0	—		—		·		*0*	0 (6)
20	0,05	*431*	35 (3)	—		—		—	
20	0,5	*451*	18 (2)	*261*	30 (2)	—		—	
20	5,0	*362*	31 (3)	*232*	28 (3)	—			
20	10,0	*390*	6 (3)	*245*	16 (3)	—		—	
20	20,0	—		*236*	14 (3)	—		—	

* Nur 3 der 6 Parallelen waren angegangen. — ** Nach 16 Tagen ganz schwache Entwicklung.

Kulturdauer: 10, 10, 11 und 10 Tage.

Nährlösung: Wasser dest. 1000; Saccharose 200; $(NH_4)_2SO_4$ 20; K_2HPO_4 1; $MgSO_4$ 1; Citronensäure 0,5; $FeSO_4$ 0,1; $ZnSO_4$ 0,01; $CuSO_4$ 0,005; Asparagin 0,5. p_H 6,55.

S. 356. Andererseits ist er gegen Sublimat viel resistenter und wird in Versuchen 1 und 2 weder durch 10 noch durch 20 mg% geschädigt, in Versuch 3 erst durch 40 mg%, welche Gabe in Versuch 4 jedoch gänzlich hemmte, während dort 20 mg% noch keine Schädigung erkennen ließ. Eine schwache, aber unsichere Förderung durch niedrigere Sublimatgaben ist in Versuchen 1 und 3 angedeutet.

Sublimatschädigung, behoben durch Magnesiumsulfat: Da Versuc] und 2 keine Sublimatschädigung erkennen lassen, so kann auch Antagonismus nicht hervortreten. Doch ist zu bemerken, daß in V such 2 die Sublimatwerte bei 4 $MgSO_4$ beträchtlich über der Kontr liegen. Der Ertrag ist im höchsten Falle auf das 1,16fache gestieg was bei dem hohen Kontrollwert (916 mg, Steigerung auf 1059 n um so höher zu bewerten ist. In Versuch 3 ist die Schädigung du 40 mg% $HgCl_2$ durch 4 $MgSO_4$ nicht behoben, sondern noch verstär. während der Wert für 20 $HgCl_2$ + 4 $MgSO_4$ ebenfalls über dem e sprechenden ohne $MgSO_4$ und über der sublimatfreien Kontrolle lie Dagegen zeigt sich in Versuch 4 der Antagonismus sehr deutlich: We auch 4 $MgSO_4$ eine Schädigung bei 20 mg% $HgCl_2$ bedingt, so i doch der Pilz bei 40 und 60 mg% $HgCl_2$ in Gegenwart von 4 MgS(gewachsen, ohne dieses überhaupt nicht. Selbst bei 80 mg% HgC trat in Gegenwart dieser $MgSO_4$-Gabe nach 16 Tagen noch eine gerin fügige Entwicklung ein. Auch hier konnte also Magnesiumsulfat ein gänzliche Hemmung der Entwicklung durch Sublimat aufheben. Den es handelte sich nicht um eine zeitliche Hemmung, da auch nach längere Zeit in den Sublimatkolben ohne hohe $MgSO_4$-Gabe keine Entwicklun mehr eintrat. Im übrigen fällt auch nach *Pulst* beim Sublimat di tödliche Dosis nahezu mit der hemmenden zusammen.

Das tritt durch folgende Beobachtung noch schärfer in Erscheinung. Nach Abbruch des Versuches wurde aus den Sublimatkolben in neue Nährlösung, die zu 25 ccm 1 g $MgSO_4$ erhielt, je 1 ccm übergeimpft: Die reinen, ohne hohe $MgSO_4$-Gabe verbliebenen Kolben des Ausgangsversuches ergaben keine Entwicklung mehr, der Pilz war also offenbar abgestorben. Entwicklung trat hingegen ein bei einem Teil der Kolben, die ursprünglich 80 mg% Sublimat erhalten hatten + 4 $MgSO_4$, und in denen sich der Pilz, wie erwähnt, ja auch noch sehr spät entwickelte, ohne neue Überimpfung.

Magnesiumsulfatschädigung, behoben durch Sublimat: Diese ist für 4 $MgSO_4$ in Versuchen 1 bis 3 vorhanden, nicht in Versuch 4. Für 20 $MgSO_4$ zeigt sie sich in Versuch 1, nicht in Versuch 2. In den beiden höchsten Fällen steigt der Ertrag durch Sublimat auf das 2,1fache ($MgSO_4$ 4, $HgCl_2$ 5 mg%, Versuch 2, von 500 auf 1059 mg Ernte) bzw. auf das 2,3fache ($MgSO_4$ 4, $HgCl_2$ 20 mg%, Versuch 3, von 402 auf 912 mg Ernte).

Fusarium der coeruleum-Gruppe (Tabelle IV).

Wirkung von Magnesiumsulfat und Sublimat: Auch dieser Pilz ist gegen Magnesiumsulfat bedeutend empfindlicher als die beiden *Aspergillus*-Arten, wenn auch nicht so stark wie *Mucor pusillus*; gegen Sublimat ist er jedoch recht empfindlich. 2,5 mg% schädigen stets, sogar 0,1

Tabelle IV. *Fusarium coeruleum und Cunninghamella elegans.* Antagonismus zwischen Magnesiumsulfat und Sublimat.

g $MgSO_4$	mg% Sublimat	*Fusarium coeruleum*				*Cunninghamella elegans*	
		Versuch 1		Versuch 2			
		mg Mycel	M. S.	mg Mycel	M. S.	mg Mycel	M. S.
0,1 (K)	0	*149*	13 (3)	*145*	24 (4)	*461*	22 (4)
4	0	*133*	9 (2)	*148*	9 (4)	—	
12	0	—		–		*143*	24 (4)
20	0	*131*	11 (3)	*116*	11 (4)	*76*	14 (4)
0,1 (K)	0,1	*165*	14 (3)	*110*	2 (4)	—	
0,1 (K)	1,0	*142*	8 (3)	*112*	6 (5)	*371*	39 (3)
0,1 (K)	2,5	*93*	3 (3)	*114*	9 (5)	-	
0,1 (K)	5,0	*52*	18 (4)	*80*	15 (5)	*308*	43 (4)
0,1 (K)	10,0	—		*63*	7 (4)	*206*	23 (3)
0,1 (K)	20,0	—		—		*131*	14 (4)
4	1,0	*191*	9 (3)	*139*	14 (4)	—	
4	2,5	*142*	8 (3)	*133*	4 (4)	—	
4	5,0	*147*	3 (3)	*118*	19 (3)	—	
4	10,0	– –		*84*	11 (4)	—	
12	5,0	—		– –		*57*	15 (4)
12	20,0	—		– –		*16*	8 (4)
20	1,0	*134*	16 (3)	*130*	11 (4)	– –	
20	2,5	*145*	14 (6)	*151*	18 (4)	– –	
20	5,0	*148*	15 (5)	*174*	6 (4)	*31*	12 (4)
20	10,0	—		*134*	17 (4)	—	
20	20,0	-		—		*8*	2 (4)

Kulturdauer: 13, 12 und 13 Tage.
Nährlösung: Wie in Tabelle XII bzw. XI (ohne Bor); für *Cunningh.* betragen die $MgSO_4$ (K)-Werte 0,25.

und 1,0 mg% im Versuch 2, nicht im Versuch 1. Magnesiumsulfat ist ebenfalls schon in verhältnismäßig geringer Konzentration schädlich; die Gabe 20 wirkte in beiden, 4 nur in Versuch 1 schädlich.

Sublimatschädigung, behoben durch Magnesiumsulfat: Der Antagonismus ist sehr deutlich; bei allen Sublimatgaben liegen die Werte bei Vorhandensein der beiden Magnesiumsulfatkonzentrationen 4 und 20 über den Werten beim Fehlen von Magnesiumsulfat. Die Steigerung beträgt im höchsten Falle (5,0 mg% $HgCl_2$, 20 $MgSO_4$, Versuch 1) das 2,8fache, von 52 auf 148 mg Ernte. Dabei liegt in einem Falle (1,0 $HgCl_2$, 4 $MgSO_4$, Versuch 1) die Ernte beträchtlich höher als die der Kontrolle (149 gegen 191 mg Ernte).

Magnesiumsulfatschädigung, behoben durch Sublimat: Auch diese Wirkung ist überall deutlich. Insbesondere zeigt sich bei 20 $MgSO_4$, daß Sublimat mit wachsender Konzentration bis zur Grenze von 5 mg% stärker antagonistisch wirkt: 130, 151 und 174 mg Ernte für 1,0, 2,5 und 5,0 mg% $HgCl_2$. Da die Schädigung durch Magnesiumsulfat

Sublimatschädigung, behoben durch Magnesiumsulfat: Da Versuche 1 und 2 keine Sublimatschädigung erkennen lassen, so kann auch der Antagonismus nicht hervortreten. Doch ist zu bemerken, daß in Versuch 2 die Sublimatwerte bei 4 $MgSO_4$ beträchtlich über der Kontrolle liegen. Der Ertrag ist im höchsten Falle auf das 1,16fache gestiegen, was bei dem hohen Kontrollwert (916 mg, Steigerung auf 1059 mg) um so höher zu bewerten ist. In Versuch 3 ist die Schädigung durch 40 mg% $HgCl_2$ durch 4 $MgSO_4$ nicht behoben, sondern noch verstärkt, während der Wert für 20 $HgCl_2$ + 4 $MgSO_4$ ebenfalls über dem entsprechenden ohne $MgSO_4$ und über der sublimatfreien Kontrolle liegt. Dagegen zeigt sich in Versuch 4 der Antagonismus sehr deutlich: Wenn auch 4 $MgSO_4$ eine Schädigung bei 20 mg% $HgCl_2$ bedingt, so ist doch der Pilz bei 40 und 60 mg% $HgCl_2$ in Gegenwart von 4 $MgSO_4$ gewachsen, ohne dieses überhaupt nicht. Selbst bei 80 mg% $HgCl_2$ trat in Gegenwart dieser $MgSO_4$-Gabe nach 16 Tagen noch eine geringfügige Entwicklung ein. Auch hier konnte also Magnesiumsulfat eine gänzliche Hemmung der Entwicklung durch Sublimat aufheben. Denn es handelte sich nicht um eine zeitliche Hemmung, da auch nach längerer Zeit in den Sublimatkolben ohne hohe $MgSO_4$-Gabe keine Entwicklung mehr eintrat. Im übrigen fällt auch nach *Pulst* beim Sublimat die tödliche Dosis nahezu mit der hemmenden zusammen.

Das tritt durch folgende Beobachtung noch schärfer in Erscheinung: Nach Abbruch des Versuches wurde aus den Sublimatkolben in neue Nährlösung, die zu 25 ccm 1 g $MgSO_4$ erhielt, je 1 ccm übergeimpft: Die reinen, ohne hohe $MgSO_4$-Gabe verbliebenen Kolben des Ausgangsversuches ergaben keine Entwicklung mehr, der Pilz war also offenbar abgestorben. Entwicklung trat hingegen ein bei einem Teil der Kolben, die ursprünglich 80 mg% Sublimat erhalten hatten + 4 $MgSO_4$, und in denen sich der Pilz, wie erwähnt, ja auch noch sehr spät entwickelte, ohne neue Überimpfung.

Magnesiumsulfatschädigung, behoben durch Sublimat: Diese ist für 4 $MgSO_4$ in Versuchen 1 bis 3 vorhanden, nicht in Versuch 4. Für 20 $MgSO_4$ zeigt sie sich in Versuch 1, nicht in Versuch 2. In den beiden höchsten Fällen steigt der Ertrag durch Sublimat auf das 2,1fache ($MgSO_4$ 4, $HgCl_2$ 5 mg%, Versuch 2, von 500 auf 1059 mg Ernte) bzw. auf das 2,3fache ($MgSO_4$ 4, $HgCl_2$ 20 mg%, Versuch 3, von 402 auf 912 mg Ernte).

Fusarium der coeruleum-Gruppe (Tabelle IV).

Wirkung von Magnesiumsulfat und Sublimat: Auch dieser Pilz ist gegen Magnesiumsulfat bedeutend empfindlicher als die beiden *Aspergillus*-Arten, wenn auch nicht so stark wie *Mucor pusillus*; gegen Sublimat ist er jedoch recht empfindlich. 2,5 mg% schädigen stets, sogar 0,1

Tabelle IV. *Fusarium coeruleum und Cunninghamella elegans.* Antagonismus zwischen Magnesiumsulfat und Sublimat.

g $MgSO_4$	mg% Sublimat	*Fusarium coeruleum*				*Cunninghamella elegans*	
		Versuch 1		Versuch 2			
		mg Mycel	M. S.	mg Mycel	M. S.	mg Mycel	M. S.
0,1 (K)	0	***149***	13 (3)	***145***	24 (4)	***481***	22 (4)
4	0	*133*	. 9 (2)	*148*	9 (4)	—	
12	0	—		—		*143*	24 (4)
20	0	***131***	11 (3)	***116***	11 (4)	*76*	14 (4)
0,1 (K)	0,1	*165*	14 (3)	*110*	2 (4)	—	
0,1 (K)	1,0	*142*	8 (3)	*112*	6 (5)	*371*	39 (3)
0,1 (K)	2,5	*93*	3 (3)	*114*	9 (5)	—	
0,1 (K)	5,0	***52***	18 (4)	***80***	15 (5)	*308*	43 (4)
0,1 (K)	10,0	—		*63*	7 (4)	*206*	23 (3)
0,1 (K)	20,0	—		—		*131*	14 (4)
4	1,0	*191*	9 (3)	*139*	14 (4)	—	
4	2,5	*142*	8 (3)	*133*	4 (4)	—	
4	5,0	*147*	3 (3)	*118*	19 (3)	—	
4	10,0	—		*84*	11 (4)	—	
12	5,0	—		—		*57*	15 (4)
12	20,0	—				*16*	8 (4)
20	1,0	*134*	16 (3)	*130*	11 (4)	—	
20	2,5	*145*	14 (6)	*151*	18 (4)	—	
20	5,0	***148***	15 (5)	***174***	6 (4)	*31*	12 (4)
20	10,0	—		*134*	17 (4)	—	
20	20,0	—		—		*8*	2 (4)

Kulturdauer: 13, 12 und 13 Tage.
Nährlösung: Wie in Tabelle XII bzw. XI (ohne Bor); für *Cunningh.* betragen die $MgSO_4$ (K)-Werte 0,25.

und 1,0 mg% im Versuch 2, nicht im Versuch 1. Magnesiumsulfat ist ebenfalls schon in verhältnismäßig geringer Konzentration schädlich; die Gabe 20 wirkte in beiden, 4 nur in Versuch 1 schädlich.

Sublimatschädigung, behoben durch Magnesiumsulfat: Der Antagonismus ist sehr deutlich: bei allen Sublimatgaben liegen die Werte bei Vorhandensein der beiden Magnesiumsulfatkonzentrationen 4 und 20 über den Werten beim Fehlen von Magnesiumsulfat. Die Steigerung beträgt im höchsten Falle (5,0 mg% $HgCl_2$, 20 $MgSO_4$, Versuch 1) das 2,8fache, von 52 auf 148 mg Ernte. Dabei liegt in einem Falle (1,0 $HgCl_2$, 4 $MgSO_4$, Versuch 1) die Ernte beträchtlich höher als die der Kontrolle (149 gegen 191 mg Ernte).

Magnesiumsulfatschädigung, behoben durch Sublimat: Auch diese Wirkung ist überall deutlich. Insbesondere zeigt sich bei 20 $MgSO_4$, daß Sublimat mit wachsender Konzentration bis zur Grenze von 5 mg% stärker antagonistisch wirkt: 130, 151 und 174 mg Ernte für 1,0, 2,5 und 5,0 mg% $HgCl_2$. Da die Schädigung durch Magnesiumsulfat

nicht sehr hoch ist, so ist auch der antagonistische Erfolg nicht sehr groß, erreicht aber immerhin bei Versuch 2 (20 $MgSO_4$, 5,0 mg% $HgCl_2$, Steigen von 116 auf 174 mg Ernte) das 1,5fache.

Cunninghamella elegans (Tabelle IV).

Im Vergleich zu *Fusarium* ist dieser Pilz gegen Magnesiumsulfat etwas empfindlicher, gegen Sublimat jedoch erheblich resistenter und nähert sich in dieser Hinsicht *Mucor pusillus*. Ein Antagonismus ist jedoch nicht zu beobachten: Beide Stoffe summieren sich vielmehr zu einer vernichtenden Schädigung, wie die Zahlen der Tabelle IV zeigen.

Antagonismus zwischen Magnesiumsulfat und Borsäure.

Herstellung der Borsäurelösungen.

Bor konnte in Form von *Borsäure* und von *Borax* gegeben werden, deren Lösungen sich stark in der Konzentration der Wasserstoffionen unterscheiden: Eine 4 %ige Borsäurelösung besitzt einen p_H-Wert von 4,45, eine 4 %ige Boraxlösung einen solchen von 9,18. Für die jeweilige Nährlösung wurde nun ein Borsäure/Borax-Gemisch verwendet von gleichem p_H-Wert wie die Nährlösung. Da der Borgehalt beider Verbindungen ungleich ist (17,8 bzw. 11,5 % Bor), so mußte außerdem eine entsprechende Mischung verwendet werden, um auf gleichen Borgehalt zu kommen. Da ursprünglich von einer 4 %igen Borsäurelösung ausgegangen wurde, so wurden die Mischungen auf diesen Wert eingestellt, so daß nachher auf je 100 ccm der fertigen Mischung 17,8 % Bor, der Gehalt der Borsäure daran, entfielen. Infolge des geringeren Gehaltes des Borax an Bor waren die Mischungen dann natürlich nicht 4 %ig wie die reine Borsäurelösung, sondern entsprechend etwas höherprozentig. Im einzelnen ergaben sich folgende Mischungen und p_H-Werte, wobei ferner die p_H-Werte der verwendeten Lösungen angegeben sind (Tabelle V):

Tabelle V. Borsäure-/Borax-Mischungen.

Pilz	p_H der Nährlösung	Mischung Borsäure /Borax	% Borsäure	% Borax	Konzentration der Mischung	p_H der Mischung
Aspergillus flavus	4,50	1/0	4	0	4	4,45
Penicillum glaucum....	6,20	15/1	3,828	0,255	4,083	6,18
Mucor pusillus	6,55	7/1	3,647	0,521	4,168	6,53
Mucorinee (unbestimmt)	6,93	4/1	3,430	0,858	4,288	6.88
Cunninghamella elegans	7,02	3,5/1	3,340	0,964	4,304	7,04
Aspergillus niger	7.32	2.5/1	3.180	1.272	4.452	7.28

Absidia cylindrospora und *Rhizopus nigricans* wie *Mucor pusillus*, *Fusarium coeruleum* wie *Aspergillus niger*.

Nach zweimaligem Sterilisieren und Stehenlassen 24 Stunden in Kolben von Jenaer 20er Glas wurde kein Unterschied in den p_H-Werten mit und ohne Borsäurezusatz festgestellt.

Es wurde nun weiter so verfahren, daß die Nährlösung um 20 % stärker angesetzt wurde; die Kolben erhielten davon je 20 ccm. Die Borsäure-

mischungen wurden dann, auf 5 ccm Wasser aufgefüllt, hinzugefügt; nur die Mengen ab 0,8 % wurden als Substanz zu den 25 ccm der Nährlösung gewogen. Die in den Tabellen angegebenen Werte geben somit Prozentzahlen an. Durch das Hinzuwiegen in Substanz der höheren Borsäuregaben ändern sich diese prozentigen Zahlen nicht, da diese Mengen absolut zu gering sind. Die Zahlen bedeuten, entsprechend dem Ausgang von Borsäure aus, % an Borsäure in der fertigen Nährlösung. Je 0,1 % davon würden demnach 0,0178 % elementarem Bor entsprechen.

Aspergillus niger (Tabelle VI).

Wirkung von Magnesiumsulfat und Bor: Die Schädigungsschwelle von Magnesiumsulfat liegt etwas tiefer als bei den Sublimatversuchen der Tabelle I. Übereinstimmend mit diesen Versuchen ist in Versuch 2 schon ein Absinken des Ertrages bei der ersten Magnesiumsulfatgabe 20 zu erkennen, während diese Gabe in Versuchen 1 und 3 eine deutliche Steigerung des Ertrages zur Folge hat und das Absinken erst bei der Gabe 28 erfolgt, nur daß diese Verhältnisse im Falle der Tabelle I nach höheren Konzentrationen von Magnesiumsulfat verschoben sind. Bor scheint in geringen Gaben etwas zu fördern; doch bleibt das Ergebnis unsicher. Eine deutliche Schädigung ist erst bei 0,8 % Bor zu erkennen, wo der Ertrag der Kontrolle gegenüber auf 52 % gesunken ist.

Tabelle VI. *Aspergillus niger.* Antagonismus von Magnesiumsulfat und Borsäure.

g $MgSO_4$	% Borsäure	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
		mg Mycel	M. S.	mg Mycel	M. S.	mg Mycel	M. S.
0,1 (K)	0	**718**	41 (3)	**670**	10 (3)	**603**	12 (3)
20	0	*889*	85 (3)	*520*	18 (3)	*838*	43 (3)
28	0	**500**	62 (3)	**387**	14 (3)	**485**	21 (3)
0,1 (K)	0,1	—		*658*	16 (3)	*620*	18 (3)
0,1 (K)	0,3	*802*	13 (3)	**612**	42 (3)	**631**	15 (3)
0,1 (K)	0,5	**703**	34 (4)	*570*	20 (4)	*574*	7 (3)
0,1 (K)	0,8	—		—		**316**	26 (3)
20	0,1	—		*553*	38 (3)	—	
20	0,3	*986*	52 (3)	**784**	54 (5)	*942*	36 (5)
20	0,5	*942*	12 (6)	*587*	65 (3)	*1000*	27 (5)
28	0,1	—		*460*	31 (3)	—	
28	0,3	*771*	43 (4)	**626**	53 (4)	**1002**	32 (5)
28	0,5	**881**	16 (6)	*733*	94 (3)	*991*	39 (6)
28	0,8	—		—		**924**	18 (4)

Nährlösung: Wasser dest. 1000; Saccharose 100; KNO_3 10; $MgSO_4$ 1; Na_2HPO_4 2,5; $FeSO_4$ 0,3; $ZnSO_4$ 0,005; $CuSO_4$ 0,0025; p_H 7,3.
Kulturdauer: jeweils 8 Tage.
Mischung: Borsäure/Borax = 2,5/1. p_H 7,28.

Borschädigung, behoben durch Magnesiumsulfat: Die Borschädigung durch 0,8 % Borsäure in Versuch 3 wird durch 28 $MgSO_4$ völlig behoben;

der Ertrag erreicht sogar der Kontrolle gegenüber das 1,5fache (von 603 auf 924 mg Ernte). Ebenso werden die übrigen Borschädigungen aufgehoben. Auch überall da, wo keine Borschädigung eingetreten ist, liegt der Ertrag bei Zugabe von $MgSO_4$ über der Kontrolle und geht noch über den Ertrag bei fördernder Wirkung von Magnesiumsulfat allein hinaus, und zwar für beide Konzentrationen des Magnesiumsulfats. Der Kontrolle gegenüber ist der Ertrag in den drei Versuchen maximal auf das 1,4-, 1,2- und 1,7fache (von 718 auf 981, von 670 auf 784 und von 603 auf 1002 mg Mycel) erhöht, der optimalen Magnesiumsulfatwirkung gegenüber auf das 1,1-, 1,2- und 1,2fache (von 889 auf 981, von 670 auf 784 und von 838 auf 1002 mg Mycel). Immerhin bedeutet diese verhältnismäßig geringe Steigerung viel, wenn man die hohen Ernten berücksichtigt.

Magnesiumsulfatschädigung, behoben durch Bor: Auch sie ist in allen drei Versuchen zu erkennen und beträgt im Maximalfall das 2,0-, 1,9- und 2,1fache (Steigerung von 500 auf 981, von 387 auf 733 und von 485 auf 1002 mg Mycel). Deutlich zeigt sich, daß 0,1 % Bor noch keine antagonistische Wirkung ausübt, bzw. erst eine sehr geringe, eine gute dagegen 0,3 % Bor; in Versuchen 1 und 2 bringt 0,5 % Borsäure noch eine weitere Steigerung für 28 $MgSO_4$ (771 und 981 bzw. 626 und 733 mg Ernte), in Versuch 3 bleiben die Erträge gleich, während 0,8 % Bor einen leichten Rückgang zur Folge hat.

Aspergillus flavus (Tabelle VII).

Wirkung von Magnesiumsulfat und Bor: Hinsichtlich der Wirkung des Magnesiumsulfats liegen die Dinge wie bei den Sublimatversuchen in Tabelle II; der Pilz ist erheblich resistenter als *Asp. niger*. Eine Förderung durch geringere Konzentrationen von Magnesiumsulfat tritt hier teilweise sehr stark in Erscheinung, wie in Versuchen 1 und 5. Gegen Bor verhält sich der Pilz wie *Asp. niger*. Die Schädigung ist bei allen Borgaben von 0,1 % ab zu erkennen, erreicht aber erst bei 0,8 % größere Ausmaße; der Ertrag ist hier bei Versuch 3 auf 23 % abgesunken, bei 2 und 4 auf 67 bzw. 63 %, bei Versuch 5 dagegen nur auf 86 %, verglichen mit den Kontrollen. Eine Förderung durch Bor ist hier nicht zu erkennen.

Borschädigung, behoben durch Magnesiumsulfat: Die Behebung der Borschäden durch höhere Konzentrationen von Magnesiumsulfat ist überall zu erkennen, wobei insbesondere Versuch 2 zeigt, daß die durch 0,5 % Bor hervorgerufene Schädigung um so stärker behoben wird, je höher die Konzentration von Magnesiumsulfat ist: Es ergibt sich eine Steigerung durch 20 bzw. 28 bzw. 40 $MgSO_4$ auf das 1,2-, bzw. 1,4- bzw. 1,5fache (von 492 auf 608, 673, 725 mg Mycel). Eine besonders starke Behebung erfährt die in Versuch 3 bei 0,8 % Bor eingetretene

Tabelle VII. *Aspergillus flavus*. Antagonismus zwischen Magnesiumsulfat und Bor.

g $MgSO_4$	% Bor	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		Versuch 4		Versuch 5	
		mg Mycel	M. S.	mg Mycel	M. S.	mg Mycel	M. S.	mg Mycel	M. S.	mg Mycel	M. S.
0,05 (K)	0	**424**	5 (3)	**636**	14 (8)	**618**	11 (3)	**648**	28 (3)	**882**	16 (3)
4	0	790	2 (3)	803	11 (3)	—		—		—	
20	0	753	29 (3)	886	15 (4)	—		—		—	
28	0	751	34 (3)	832	26 (7)	—		—		923	11 (2)
40	0	—		**571**	72 (7)	596	48 (3)	—		865	21 (3)
48	0	—		—		416	54 (3)	415	18 (3)	722	18 (3)
60	0	—		137	8 (3)	**74**	19 (5)	**208**	10 (3)	**530**	24 (3)
0,05 (K)	0,01	—		—		—		640	18 (4)	681	34 (3)
0,05 (K)	0,1	406	15 (3)	551	14 (3)	—		602	10 (4)	636	11 (3)
0,05 (K)	0,3	366	14 (3)	**531**	28 (4)	588	3 (3)	588	13 (3)	**601**	7 (3)
0,05 (K)	0,5	**326**	6 (3)	492	15 (5)	473	31 (3)	465	17 (3)	—	
0,05 (K)	0,8	—		431	14 (5)	**145**	6 (4)	410	9 (3)	573	13 (3)
20	0,5	**527**	13 (3)	608	18 (3)	—		—		—	
28	0,5	—		673	35 (8)	—		—		846	20 (4)
28	0,8	—		555	29 (8)	—		—		746	6 (4)
40	0,3	—		**782**	12 (5)	—		—		—	
40	0,5	—		725	23 (8)	—		—		898	15 (4)
40	0,8	—		616	21 (5)	—		—		—	
48	0,5	—		—		645	41 (3)	—		—	
48	0,8	—		—		**485**	36 (3)	521	32 (3)	636	3 (4)
60	0,01	—		—		—		300	28 (3)	718	8 (4)
60	0,1	—		—		—		427	41 (3)	816	46 (3)
60	0,3	—		—		**172**	3 (4)	**435**	34 (3)	**823**	8 (3)
60	0,5	—		—		154	11 (4)	—		—	
60	0,8	—		—		149	9 (4)	—		595*	16 (2)

Kulturdauer: 5, 6, 7, 7 und 10 Tage; bei * 16 Tage.

Nährlösung: Wasser dest. 1000; Saccharose 100; KH_2PO_4 5; $MgSO_4$ 0,5; KNO_3 33,5; NaCl, $MnSO_4$, $FeSO_4$, Citronensäure je 0,01; $ZnSO_4$ 2 Tropfen 1%ige Lösung; $CuSO_4$ 1 Tropfen 1%ige Lösung. p_H 4,5. Borsäure 4%, p_H 4,45.

Schädigung mit einer Erntesteigerung auf das 3,3fache durch 48 $MgSO_4$ (von 145 auf 485 mg Mycel), während die Gabe 60 dieses Salzes wirkungslos bleibt. Die antagonistischen Werte liegen zum Teil noch über der Kontrolle, übersteigen aber, im Gegensatz zu den Verhältnissen bei *Asp. niger*, nicht die Werte der stärksten $MgSO_4$-Förderung.

Magnesiumschädigung, behoben durch Bor: Der Antagonismus ist überall da zu erkennen, wo Schädigungen durch Magnesiumsulfat eingetreten sind. In Versuch 3 läßt 0,3 % Borsäure die $MgSO_4$-Schädigung durch die Gabe 60 auf das 2,3fache der Ernte ansteigen (von 74 auf 172 mg Mycel), in Versuch 4 für die gleichen Konzentrationen auf das 2,1fache (von 208 auf 435 mg Mycel). Es ist auch deutlich zu erkennen,

daß Bor abgestuft wirkte. Bei 60 $MgSO_4$ in Versuchen 4 und 5 hat zwar 0,01 % Borsäure bereits eine gute antagonistische Wirkung, 0,1 % steigert sie aber noch weiter, in Versuch 4 von 208 auf 300 und weiter auf 427 mg Mycel; sogar 0,3 % Borsäure brachten noch keinen Rückgang mit der noch etwas höheren Ernte von 435 mg Mycel.

Den Magnesiumsulfat-Borsäure-Antagonismus zeigt für *Aspergillus flavus* Abb. 3, wobei der antagonistische Wert über die beiden

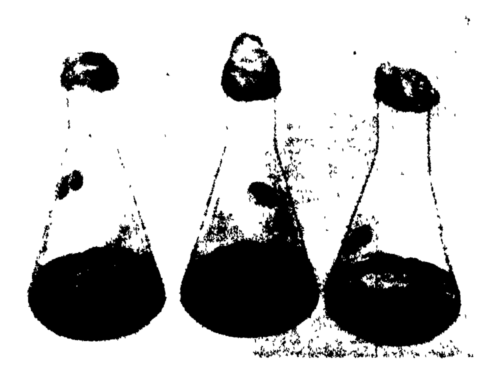


Abb. 3. *Aspergillus flavus*, Antagonismus zwischen Magnesiumsulfat und Borsäure nach 7 Tagen Kulturdauer.

Kolben von links nach rechts:

Behandlung g $MgSO_4$ zu 100 ccm	0,05	48	48
% Borsäure	0,5	0,5	0
mg Pilzmycel (Einzelwerte)	443	700	338
mg Pilzmycel (Mittelwerte)	473	645	416

jeweiligen Giftwerte erheblich hinausgeht. Die Ertragswerte dieses in Tabelle VII nicht aufgenommenen Versuches finden sich unter der Abbildung.

Mucor pusillus (Tabellen VIII bis X).

Wirkung von Magnesiumsulfat und Bor: Wie bei den Sublimatversuchen S. 335 zeigt sich auch hier der Pilz, wie die Zahlen der Tabelle IX zeigen, gegen Magnesiumsulfat recht empfindlich, jedoch ist die Wirkung sehr unregelmäßig. Während schon 2,0 $MgSO_4$ in den Versuchen 1, 2 und 4 schwach, die Gabe 4 stark schädigen, haben beide Konzentrationen in Versuch 3 zu einem deutlichen Ertragsanstieg geführt; es liegen also, abgesehen von der Konzentrationsschwelle, ähnliche Verhältnisse vor wie bei *Aspergillus niger* und *flavus*. Zum Teil mag hier die Wachstumszeit eine Rolle spielen, da Versuch 3 (Tabelle IX) 15 Tage lief, die Schädigung somit ausgeglichen sein konnte. Indessen zeigt ein Vergleich von Versuch 1 und 2 (Tabelle IX), daß dies nicht die alleinige Ursache sein konnte. Denn in Versuch 2, der 11 Tage lief, hatte 20 $MgSO_4$ zu einer starken Schädigung geführt.

Tabelle VIII. *Mucor pusillus.* Schädigung durch Magnesiumsulfat und Bor bei verschiedener Eisenkonzentration.

g $MgSO_4$	% Borsäure	% $FeSO_4 \cdot 7\,H_2O$							
		0,001		0,01		0,05		0,1	
		mg Mycel	M. S.	mg Mycel	M. S.	mg Mycel	M. S.	mg Mycel	M. S.
0,1 (K)	0	*812*	41	*1037*	34	*1142*	21	*1183*	12
4	0	*476*	43	*561*	42	*601*	8	*605*	52
20	0	*391*	13	*490*	31	*468*	24	*403*	23
32	0	*379*	28	*485*	27	*514*	16	*441*	40
		(46,7 %)		(46,8 %)		(45,0 %)		(37,3 %)	
0,1 (K)	0,01	*603*	72	—		—		—	
0,1 (K)	0,1	*523*	81	*1031*	16	*1087*	22	*1118*	43
0,1 (K)	0,3	*462*	20	*826*	53	*951*	20	*1085*	26
0,1 (K)	0,5	*388*	16	*439*	13	*771*	11	*804*	21
0,1 (K)	0,8	*53*	14	*268*	41	*431*	31	*654*	44
		(6,5 %)		(25,9 %)		(37,3 %)		(57,5 %)	
20	0,5	*349*	27	*415*	23	*436*	34	*382*	23

Kulturdauer: 13 Tage. Je 4 Parallelen. Nährlösung wie Tabelle IX.

Tabelle IX. *Mucor pusillus.* Antagonismus zwischen Magnesiumsulfat und Borsäure.

g $MgSO_4$	% Borsäure	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		Versuch 4	
		mg Mycel	M. S.	mg Mycel	M. S.	mg Mycel	M. S.	mg Mycel	M. S.
0,1 (K)	0	***834***	51 (6)	***773***	14 (3)	***1079***	31 (5)	***882***	13 (5)
2	0	*562*	43 (8)	*765*	18 (4)	*1246*	53 (5)	*848*	55 (3)
4	0	*533*	39 (8)	*389*	86 (4)	*1235*	34 (7)	*757*	61 (5)
20	0	*371*	62 (8)	***135***	55 (4)	*908*	104 (6)	***383***	28 (5)
28	0	*268*	41 (8)	—		*568*	59 (6)	*246*	34 (5)
40	0	—		—		*403*	7 (3)	—	
0,1 (K)	0,01	*617*	15 (4)	*850*	19 (4)	*1060*	45 (3)	*892*	14 (3)
0,1 (K)	0,1	*594*	63 (5)	*765*	8 (3)	*1046*	16 (5)	*851*	16 (4)
0,1 (K)	0,2	—		*701*	43 (3)	—		—	
0,1 (K)	0,3	*497*	3 (4)	*526*	32 (3)	*888*	42 (4)	*847*	19 (4)
0,1 (K)	0,5	*452*	71 (6)	*394*	15 (4)	*652*	24 (5)	*447*	62 (4)
0,1 (K)	0,8	*256*	26 (3)	*307*	32 (4)	—		—	
0,1 (K)	1,0	*183*	42 (4)	*168*	13 (4)	*396*	41 (4)	*300*	43 (4)
20	0,1	*243*	13 (4)	—		*534*	24 (4)	***472***	43 (4)
20	0,3	*241*	11 (3)	—		*515*	92 (3)	*466*	25 (4)
20	0,5	*221*	23 (3)	***280***	42 (4)	*448*	42 (4)	*456*	22 (4)
20	1,0	—		—		*182*	41 (2)	*241*	34 (4)
28	0,3	—		—		*300*	16 (4)	*184*	42 (3)
28	0,5	—		—		*201*	11 (4)	—	
28	1,0	*133*	5 (3)	*179*	41 (3)	—		—	

Kulturdauer: 8, 11, 15 und 12 Tage.
Nährlösung: Wasser dest. 1000; Saccharose 200; $(NH_4)_2SO_4$ 20; K_2HPO_4 1; $MgSO_4$ 1; Citronensäure 0,5; $FeSO_4$ 0,1; $ZnSO_4$ 0,01; $CuSO_4$ 0,005; Asparagin 0,5. p_H 6,55.
Mischung: Borsäure/Borax = 7/1; p_H 6,53.

in Versuch 1 (8 Tage Kulturdauer) dagegen zu einer viel geringeren. Jedenfalls sinkt auch hier die $MgSO_4$-Schädigungskurve bei hohen Gaben sehr langsam ab, bei anfänglich schnellem Sinken. Die beiden Werte belaufen sich in % der Kontrolle auf 17,5 bzw. 58,5. Hierauf wird später (S. 356) noch zurückzukommen sein.

Gegen Bor ist der Pilz sehr resistent. Die folgende Übersicht zeigt als Mittel drei weiterer Versuche die Schädigungsschwelle, die demnach

% Borsäure	0,01	0,1	0,3	0,5	0,75	1,0	1,25	1,5	0
mg Mycel	782	778	694	346	284	162	8	0	810

etwa bei 0,25 % Borsäure liegt. 1,5 % Bor ließ keine Entwicklung mehr zu. Es ist nun bemerkenswert, wie Tabelle VIII zeigt, daß diese Schädigung sehr stark von der Konzentration des gebotenen Eisensulfats abhängt Bei stärkerer Konzentration davon wird die Borschädigung immer geringer, wie am besten die unter dem Wert für 0,8 % Bor angegebenen %igen Erträge bei dieser Gabe, bezogen auf den Kontrollwert, zeigen. Im Gegensatz dazu zeigt die Schädigung durch Magnesiumsulfat entweder ein Gleichbleiben oder, wenn die Werte quantitativ zutreffen, sogar eine Verstärkung nach höherer Eisensulfatkonzentration, wie die unter der Magnesiumsulfatgabe 32 stehenden, auf den Kontrollwert bezogenen %igen Zahlen zeigen.

Borschädigung, behoben durch Magnesiumsulfat: Eine Wirkung ist aus Tabelle IX in keinem Falle zu erkennen, wenn man nicht die leichte Förderung durch 28 $MgSO_4$ bei 1,0 % Bor in Versuch 2 (179 gegen 168 mg Mycel) dafür ansprechen will. Daß sie aber tatsächlich, allerdings in sehr geringem Maße, vorhanden ist, zeigt der in Tabelle X wiedergegebene Versuch. Die bei 0,8 und 1,0 % Bor aufgetretenen Schädigungen werden demnach durch 4 $MgSO_4$ leicht gemildert. Man könnte den Unterschied allerdings für unsicher halten. Daß er aber wirklich vorhanden sein dürfte, ergibt sich daraus, daß bei 1,5 % Bor keine Entwicklung eintritt, wohl aber bei gleichzeitigem Vorhandensein der schädlichen Gabe von 4 $MgSO_4$. Wenn auch hier der Unterschied nur sehr gering ist, so kann doch nicht übersehen werden, daß es dann wenigstens zu einem Auskeimen und ganz geringfügiger Entwicklung des Pilzes kommt, ohne diese $MgSO_4$-Gabe jedoch nicht. *Die letale Borgabe kann also durch Magnesiumsulfat zu einer hemmenden verwandelt werden.*

Tabelle X. *Mucor pusillus.* Antagonismus zwischen Magnesiumsulfat und Borsäure bei hohen Borsäuregaben.

g $MgSO_4$	% Bor	mg Mycel	M. S.	g $MgSO_4$	% Bor	mg Mycel	M. S.
0,1 (K)	0	*844*	9 (3)	0,1 (K)	1,5	*0*	0 (3)
4	0	*336*	4 (3)	4	0,8	*231*	24 (4)
0,1 (K)	0,8	*204*	11 (3)	4	1,0	*124*	10 (4)
0,1 (K)	1,0	*111*	8 (8)	4	1,5	*2*	0 (4)

Magnesiumsulfatschädigung, behoben durch Bor: In Versuchen 1 und 3 der Tabelle IX ist keine Beeinflussung zu erkennen. In Versuch 2 wird die durch 20 $MgSO_4$ bewirkte Schädigung bei 0,5 % Bor soweit behoben, daß der Ertrag auf das 1,9fache steigt (von 135 auf 260 mg Mycel). In Versuch 4 ist bei der $MgSO_4$-Gabe 28 keine Beeinflussung zu erkennen, bei der Gabe 20 dagegen bei den Borsäuregaben 0,1, 0,3 und 0,5 % (im höchsten Falle Steigen der Ernte auf das 1,2fache, von 393 auf 472 mg Mycel), bei der Borsäuregabe 1,0 % nicht mehr. Jedenfalls kann die Wirkung als recht gering bezeichnet werden.

Cunninghamella elegans (Tabelle XI).

Wirkung von Magnesiumsulfat und Borsäure: Gegen beide Stoffe ist der Pilz recht empfindlich; schon 4 $MgSO_4$ setzt die Ernte auf unter die Hälfte der Kontrolle herab, 0,05 % Borsäure auf etwa die Hälfte.

Antagonismus: Eine Behebung der Borsäureschädigungen durch Magnesiumsulfat war nicht festzustellen, sondern eine Verstärkung der Schädigung von recht großen Ausmaßen. Schädigungen durch Magnesiumsulfat konnten durch die sehr geringe, an sich unschädliche Borsäuremenge von 0,01 % ganz wenig behoben werden (96 mg Trockensubstanz bei 20 $MgSO_4$ + 0,01 % Borsäure gegen 76 mg Trockensubstanz bei 20 $MgSO_4$ allein), wenn man diesen Unterschied überhaupt als bestehend anerkennen will. Jedenfalls kann der Antagonismus unter den gewählten Versuchsbedingungen nur ganz schwach ausgebildet sein. Ein zweiter Versuch, auf dessen Wiedergabe verzichtet werden kann, fiel gleichsinnig aus.

Absidia cylindrospora (Tabelle XI).

Wirkung von Magnesiumsulfat und Borsäure: Der Pilz ist gegen Magnesiumsulfat bedeutend resistenter; durch 20 $MgSO_4$ ist der Ertrag erst auf 70 % heruntergedrückt. Gegen Borsäure ist er recht empfindlich, etwa so wie der vorige.

Antagonismus: Der Antagonismus tritt hier jedoch etwas deutlicher in Erscheinung. Die durch 0,05 % Borsäure bewirkte starke Schädigung wird durch 20 $MgSO_4$ immerhin etwas gemildert (Steigen auf den 1,6fachen Ertrag, von 86 auf 141 mg Mycel), und auch die Schädigung durch Magnesiumsulfat 20 wird durch die geringste Borsäuregabe von 0,01 % gemildert (1,4facher Ertrag, 156 gegen 223 mg Mycel), höhere Gaben von Borsäure verstärken die Giftwirkung von Magnesiumsulfat.

Rhizopus nigricans (Tabelle XI).

Wirkung von Magnesiumsulfat und Borsäure: Die Empfindlichkeit gegen Magnesiumsulfat ist groß wie bei *Cunninghamella*, die Resistenz gegen Borsäure etwas größer als bei den beiden vorigen; selbst 0,3 % lassen noch einen, wenn auch äußerst geringen Ertrag zu.

Tabelle XI. *Absidia cylindrospora*, *Cunninghamella elegans*, *Rhizopus nigricans*, unbestimmte *Mucorinee* aus Dalmatien. Antagonismus zwischen Magnesiumsulfat und Borsäure.

g $MgSO_4$	% Borsäure	*Cunninghamella elegans* * **		*Absidia cylindrospora*		*Rhizopus nigricans*		Unbestimmte *Mucorinee* **	
		mg Mycel	M. S.	mg Mycel	M. S.	mg Mycel	M. S.	mg Mycel	M. S.
0,1 (K)	0	*481*	22 (4)	*221*	14 (6)	*178*	31 (5)	*874*	16 (3)
2	0	—		—		*121*	16 (4)	—	
4	0	*206*	32 (3)	*202*	19 (5)	*92*	18 (5)	—	
12	0	*143*	24 (4)	—		*85*	8 (4)	*619*	18 (3)
20	0	*76*	14 (4)	*156*	16 (6)	*46*	11 (5)	*460*	13 (3)
0,1 (K)	0,01	*430*	8 (3)	*206*	28 (6)	*188*	5 (5)	—	
0,1 (K)	0,05	*228*	9 (3)	*88*	12 (5)	*184*	8 (5)	*843*	24 (3)
0,1 (K)	0,1	*6*	2 (4)	*43*	11 (5)	*102*	22 (6)	*741*	22 (3)
0,1 (K)	0,2	*0*	0 (4)	—		—		*217*	18 (3)
0,1 (K)	0,3	—		*0*	0 (3)	*8*	2 (4)	*4*	2 (3)
0,1 (K)	0,5	—		—		*0*	0 (3)	—	
4	0,05	—		—		*136*	15 (5)	—	
4	0,1	—		—		*97*	9 (6)	—	
12	0,01	*138*	9 (4)	—		—		—	
12	0,05	*14*	3 (4)	—		*106*	6 (4)	*608*	84 (3)
12	0,1	*0*	0 (4)	—		*58*	7 (4)	*463*	72 (3)
12	0,2	*0*	0 (3)	—		—		*71*	25 (4)
20	0,01	*96*	22 (3)	*223*	24 (6)	—		—	
20	0,05	*8*	3 (3)	*141*	32 (5)	—		*443*	31 (3)
20	0,1	*0*	0 (4)	*58*	13 (4)	—		*315*	16 (4)
20	0,2	—		—		—		*0*	0 (3)
20	0,3	—		*0*	0 (3)	*31*	9 (5)	—	

* Ein weiterer, hier nicht wiedergegebener Versuch verlief ebenso. — ** Die $MgSO_4$-Werte betragen in diesem Falle 0,25 %. Zwei weitere hier nicht wiedergegebene Versuche verliefen ebenso.

Kulturdauer: 13, 15, 14 und 9 Tage.

Nährlösung: Für *Cunn. el.*: Wasser dest. 1000; Saccharose 100; Asparagin 8,3; $MgSO_4$ 2,5; Na_2HPO_4 2,5; K_2SO_4 5,0; Na-Citrat 1,0; $FeSO_4$ 0,3; $ZnSO_4$ 0,05; $CuSO_4$ 0,003; p_H 7,02.

Mischung: Borsäure/Borax = 3,5/1; p_H 7,04.

Nährlösung für *Abs.* und *Rh.* wie bei *Mucor*, Tabelle IX, für nicht näher bestimmte *Mucorinee* wie bei *Cunn. el.*, nur 15 Asparagin. p_H 6,93.

Mischung: Borsäure/Borax = 4/1; p_H 6,88.

Antagonismus: Eine Milderung der Borsäureschädigung tritt nur bei der Gabe von 0,3 % durch 20 $MgSO_4$ in Erscheinung (3,9facher Ertrag, 8 gegen 31 mg Mycel); bei den geringen Schwankungen kann der Antagonismus als vorhanden gelten. Die Magnesiumschädigung durch die Gabe 4 wird durch die Borsäuregabe 0,05 % leicht gemildert (1,5facher Ertrag, 92 gegen 136 mg Mycel), die Schädigung durch 12 $MgSO_4$ ebenfalls durch diese Borsäuregabe (1,3facher Ertrag, 85 gegen 106 mg Mycel). In allen anderen Fällen tritt eine Verstärkung der Giftwirkung ein.

Mucorinee, unbestimmt (Tabelle XI).

Wirkung von Magnesiumsulfat und Borsäure: Die Resistenz gegen Magnesiumsulfat ist ziemlich groß, etwa wie die von *Absidia*. Hinsichtlich der Resistenz gegen Borsäure verhält er sich wie *Rhizopus*.

Antagonismus: Eine Milderung der Borsäureschädigungen durch Magnesiumsulfat ist nicht zu erkennen; die Giftwirkung verstärkt sich. Ebenso ist keine Behebung der Magnesiumsulfatschädigung durch Borsäure zu erkennen. Zwei weitere Versuche, die nicht wiedergegeben sind, verliefen ebenso.

Penicillium glaucum (Tabelle XII).

Wirkung von Magnesiumsulfat und Borsäure: Die Resistenz gegen Magnesiumsulfat ist etwa die von *Absidia*, ebenso die Resistenz gegen Borsäure.

Antagonismus: Der Antagonismus ist hier sehr deutlich. Die Borsäureschädigungen durch 0,05 und 0,1 % werden durch Magnesiumsulfat, Gabe 20, mit Sicherheit behoben, so daß der Wert für 0,1 % Borsäure sogar noch über den Kontrollwert steigt (152 gegen 131 mg Trockensubstanz). Die Ertragsteigerung durch 0,1 % Borsäure beträgt hier das 2fache (77 gegen 152 mg Mycel). Auch die Magnesiumsulfat-

Tabelle XII. *Penicillium glaucum, Fusarium coeruleum.* Antagonismus zwischen Magnesiumsulfat und Borsäure.

g $MgSO_4$	% Bor	*Penicillium glaucum* *		*Fusarium coeruleum* *	
		mg Mycel	M. S.	mg Mycel	M. S.
0,1 (K)	0	131	16 (4)	277	43 (7)
4	0	89	7 (4)	241	51 (5)
20	0	71	13 (4)	195	34 (6)
0,1 (K)	0,01	126	11 (4)	—	
0,1 (K)	0,05	91	18 (4)	—	
0,1 (K)	0,1	77	12 (4)	153	42 (6)
0,1 (K)	0,15	56	6 (2)	—	
0,1 (K)	0,3	—		114	31 (5)
0,1 (K)	0,5	—		77	15 (6)
4	0,3	—		108	28 (6)
4	0,5	—		97	14 (6)
20	0,01	132	18 (4)	—	
20	0,05	138	14 (4)		
20	0,1	152	8 (5)	—	
20	0,3	—		58	12 (6)
20	0,5	-		37	10 (6)

* Ein weiterer Versuch verlief ebenso.

Kulturdauer: 10 und 16 Tage.

Nährlösung: Wasser dest. 1000; Rohrzucker 100; KNO_3 10; $MgSO_4$ 1; Na_2HPO_4 2,5; KCl 1,5; $FeSO_4$ 0,3; $CuSO_4$ 0,0025; $ZnSO_4$ 0,005; p_H 7,32.

Mischung: Borsäure/Borax = 2,5/1; p_H 7,28.

schädigungen werden durch Borsäure gemildert; der Ertrag steigt für 20 $MgSO_4$ bei 0,1 % Borsäure auf das 2,1fache, von 71 auf 152 mg Mycel. Ein zweiter, nicht wiedergegebener Versuch verlief qualitativ gleich.

Fusarium coeruleum (Tabelle XII).

Wirkung von Magnesiumsulfat und Borsäure: Die Resistenz gegen Magnesiumsulfat ist wie bei dem vorigen Pilz; die Resistenz gegen Borsäure ist recht hoch, wenn auch 0,1 % bereits stark schädigen.

Antagonismus: Es ist weder eine Milderung der Borsäureschädigung durch Magnesiumsulfat zu erkennen, noch das Umgekehrte: die Giftwirkungen verstärken sich. Ein zweiter, nicht wiedergegebener Versuch verlief ebenso.

Mit diesem Pilz wurden noch einige weitere Versuche angestellt, die nur ganz kurz erwähnt seien. Er wächst bei p_H 7,28 bedeutend besser als bei p_H 6,55; doch waren die Borsäureschädigungen in der sauren Nährlösung verhältnismäßig ein wenig geringer (48 % Ertrag in der sauren gegen 35 % in der schwach alkalischen Nährlösung bei 0,5 % Borsäure), was vielleicht mit der von *Rehm* beobachteten Erscheinung (gleichartige Wirkung von Hydroxylionen und Borsäure) und von *Pirschle*, der nur bei saurer Reaktion eine positive Wirkung von Bor für *Aspergillus niger* feststellte, zusammenhängt.

Einige andere Versuche zeigten die Schwierigkeit, mit diesen Objekten zu reproduzierbaren Ergebnissen zu kommen. Anstatt Eisensulfat wurde Eisencitrat gegeben, das weit besseres Mycelwachstum zuließ. Die Reaktion gegen Borsäure war aber ganz uneinheitlich: Bei zwei verschiedenen Versuchen ergab Borsäure einmal keine Schädigung durch Borsäure 0,3 und 0,5 % gegenüber 0,1 %, einmal starke Schädigung. Genau das gleiche Bild ergaben weitere Versuche bei Zusatz von 0,1 % Agar zur Nährlösung (vgl. *A. Rippel*), auf das der Pilz ebenfalls anspricht. Von der ausführlichen Wiedergabe kann abgesehen werden.

Wirkung von Sublimat, Borsäure und Magnesiumsulfat.

Es interessierte noch, wie sich die kombinierte Wirkung von Sublimat und Bor verhält. Tabelle XIII zeigt das Ergebnis für *Aspergillus flavus* und *Mucor pusillus*. Für den erstgenannten ergibt sich keine Wirkung der Kombination, die Schädigung richtet sich offenbar nach dem am meisten schädlichen Stoff. Eine Verstärkung der Giftwirkung ist z. B. für 0,8 % Borsäure durch 5 mg% Sublimat, die vor der schädlichen liegende Gabe, nicht zu bemerken. Auch die Schädigung durch 10 mg% Sublimat wird durch 0,3 % Borsäure nicht beeinflußt, durch 0,8 % Borsäure nur wenig, indem der Ertrag von 45 mg auf 18 mg abgesunken ist. Hier war auch nur eine der drei Parallelen zur Ent-

wicklung gekommen. Wenn man bedenkt, daß 0,8 % Borsäure schon deutliche Schädigungen verursachen, so kann die Verstärkung der Giftwirkung durch Kombination der beiden Stoffe nur als sehr gering veranschlagt werden.

Für *Mucor pusillus* ergibt sich ein etwas anderes Bild; die Schädigungen durch 0,5 % Borsäure werden durch Sublimat etwas ausgeglichen. Der Ertrag erhöht sich bei 5 mg% Sublimat bei Versuch 1 auf das 1,3fache (von 345 auf 430 mg Mycel), bei Versuch 2 auf das 1,5fache (von 512 auf 742 mg Mycel). Bei Versuch 2 ist dieser Antagonismus

Tabelle XIII. *Aspergillus flavus, Mucor pusillus.* Wirkung von Sublimat und Borsäure.

mg% $HgCl_2$	% Borsäure	*Aspergillus flavus*				*Mucor pusillus*			
		Versuch 1		Versuch 2		Versuch 1		Versuch 2	
		mg Mycel	M. S.	mg Mycel	M. S.	mg Mycel	M. S.	mg Mycel	M. S.
0	0	***635***	15 (2)	***595***	15 (3)	***749***	34 (3)	***916***	18 (2)
0,05	0	—		—		*774*	14 (3)	*913*	20 (3)
0,5	0	*647*	8 (3)	*597*	6 (3)	*791*	13 (4)	*831*	36 (3)
2,5	0	*639*	16 (2)	—		—		—	
5,0	0	*642*	19 (3)	*638*	12 (3)	*761*	27 (3)	*834*	14 (3)
10,0	0	*45*	4 (4)	*228*	42 (3)	*789*	15 (3)	—	
15,0	0	*0*	0 (3)	—		—		—	
20,0	0	—		—		—		*851*	31 (4)
0	0,1	—		—		*781*	61 (3)	*830*	17 (3)
0	0,3	—		*537*	14 (4)	*525*	52 (2)	*828*	15 (3)
0	0,5	—		—		***345***	14 (3)	***512***	71 (3)
0	0,8	*410*	9 (4)	*338*	9 (4)	—		—	
0,05	0,1	—		—		*760*	18 (2)	*864*	51 (4)
0,05	0,5	—		—		*445*	71 (2)	*751*	34 (3)
0,5	0,1	—		—		*765*	32 (2)	—	
0,5	0,3	—		*492*	12 (4)	—		—	
0,5	0,5	—				***430***	14 (2)	***742***	29 (2)
0,5	0,8	*440*	6 (3)	*337*	36 (4)	—		—	
2,5	0,8	—		—		—		—	
5,0	0,1	—		—		*780*	40 (2)	*831*	35 (3)
5,0	0,3	—		*489*	23 (4)	—		—	
5,0	0,5	—		—		*364*	33 (2)	—	
5,0	0,8	*393*	15 (4)	*318*	21 (4)	—		—	
10,0	0,1	—		—		*802*	53 (3)	—	
10,0	0,3	—		*211*	31 (2)	—		—	
10,0	0,5	—		—		*306*	31 (3)	***731***	24 (2)
10,0	0,8	*18*	(3)	—		—		—	
15,0	0,8	*0*	0 (2)	—		—		—	
20,0	0,1	—		—		—		*742*	13 (4)
20,0	0,5	—		—		—		[illegible]	16 (3)

Nährlösung wie in Tabelle VII (*Aspergillus*) bzw. IX (*Mucor*).

auch noch bei 10 und 20 mg% Sublimat vorhanden, bei Versuch 1 lassen 10 mg% Sublimat jedoch gegenüber 5 mg% die Schädigung wieder hervortreten. Da bei Gegenwart von 0,5% Borsäure steigende Sublimatgaben, wie die Tabelle zeigt, einen immer stärker werdenden Rückgang der Ernte verursachen, so dürfte die beobachtete teilweise Aufhebung der Giftwirkung der einzelnen Stoffe durch Kombination tatsächlich vorhanden sein. Auch bei diesem Pilz ist sie allerdings ziemlich gering, was indessen nicht ausschließt, daß es unter anderen Versuchsbedingungen oder bei anderen Pilzen anders sein kann. Nur als derartiger Hinweis mögen diese wenigen Angaben gewertet werden.

Weiterhin war dann zu fragen, wie sich der Magnesiumsulfat-Antagonismus bei gleichzeitiger Darbietung von Sublimat *und* Borsäure gestaltet; Tabelle XIV zeigt das Ergebnis. Die Schädigung durch Magnesiumsulfat kann demnach durch keine Kombination der beiden anderen Stoffe behoben werden.

Die Schädigungen durch diese beiden Stoffe werden nur in einem Falle durch Magnesiumsulfat etwas gemildert: Bei *Aspergillus flavus* mit 0,3% Borsäure ein Ertrag von 537 mg, bei 0,3% Borsäure + 0,5 mg%

Tabelle XIV. *Aspergillus flavus, Mucor pusillus.* Wirkung von Magnesiumsulfat in Gegenwart von Sublimat *und* Borsäure.

Aspergillus flavus					*Mucor pusillus*				
g $MgSO_4$	mg% Sublimat	% Borsäure	mg Mycel	M. S.	g $MgSO_4$	mg% Sublimat	% Borsäure	mg Mycel	M. S.
0,05 (K)	0	0	*595*	15 (3)	0,1 (K)	0	0	*816*	18
40	0	0	*800*	81 (3)	4	0	0	*500*	61
48	0	0	*434*	52 (4)	20	0	0	*354*	22
0,05 (K)	0,5	0	*597*	6 (3)	0,1 (K)	0,5	0	*831*	36
0,05 (K)	5,0	0	*638*	12 (3)	0,1 (K)	5,0	0	*834*	14
0,05 (K)	0	0,3	*537*	14 (4)	0,1 (K)	10,0	0	*848*	17
0,05 (K)	0	0,8	*338*	9 (4)	0,1 (K)	0	0,1	*830*	17
40	0,5	0,3	*627*	25 (3)	0,1 (K)	0	0,5	*512*	71
48	0,5	0,3	*392*	37 (4)	4	0,5	0,1	*720*	18
48	0,5	0,8	*355*	32 (4)	4	0,5	0,5	*472*	81
40	5,0	0,3	*642*	43 (3)	20	0,5	0,1	*373*	61
48	5,0	0,3	*428*	46 (4)	20	0,5	0,5	*355*	43
48	5,0	0,8	*325*	36 (4)	4	5,0	0,1	*512*	22
					4	5,0	0,5	*456*	39
					20	5,0	0,1	*334*	25
					20	5,0	0,5	*265*	32
					4	10,0	0,1	*468*	38
					4	10,0	0,5	*320*	28
					20	10,0	0,1	*242*	37
					20	10,0	0,5	*233*	24

Kulturdauer: *Asp.* 7, *Muc.* 10 Tage.

Nährlösung: *Asp.* wie Tabelle VII, *Muc.* wie Tabelle IX. Bei *Mucor* je 3 Parallelen.

Sublimat + 40 $MgSO_4$ dagegen 627 mg und bei Erhöhung auf 5 mg% Sublimat 642 mg Mycel. Diese letzten Konzentrationen (5 mg% Sublimat + 0,3 % Borsäure) wirkten jedenfalls nach Tabelle XIII schädlich. Da jedoch bei der schädlichen Gabe von 48 $MgSO_4$ keine fördernde antagonistische Wirkung eintrat, so kann diese Erscheinung kaum auf dem $MgSO_4$-Antagonismus beruhen, sondern ist vielleicht eine Wirkung des Sublimats. Auch in Tabelle XIII hat ja 0,5 mg% Sublimat bei der schädlichen Borsäuregabe 0,8 % zu einer ganz geringfügigen Erhöhung der Ernte geführt (410 gegen 440 mg Mycel). Man muß im übrigen ja auch stets, wie oben mehrfach hervorgehoben wurde, mit der ,,Launigkeit" im Ausfall der Versuche rechnen. Auf jeden Fall kann die hier gemachte Beobachtung in keiner Weise mit der in Tabelle II und VII gemachten verglichen werden, wo die schädlichen Gaben von Magnesiumsulfat durch Sublimat oder Borsäure weitgehend behoben wurden.

Ist Bor für *Mucor pusillus* notwendig?

Borbestimmung mit Chinalizarin.

Chinalizarin = 1, 2, 5, 8-tetra-oxy-Anthrachinon ist in schwefelsaurer Lösung violett gefärbt und gibt mit Bor einen Farbumschlag nach Blau (Verfahren von *Feigl* und *Krumholz*).

Verfahren: In einen Glasblock mit flacher Vertiefung (etwa 2 ccm fassend) gibt man 1 ccm konz. reine H_2SO_4, 1 bis 2 Tropfen der Untersuchungslösung und 1 bis 2 Tropfen einer 0,01 %igen Chinalizarinlösung in konz. H_2SO_4. Man schüttelt vorsichtig um, erwärmt schwach und vergleicht mit einem Blindversuch und einem Versuch mit einer bekannten Vergleichslösung. Bei sehr wenig Bor kommt der Farbumschlag erst nach mehreren Minuten. Die Untersuchungslösung ist am besten schwefelsauer oder alkoholisch. In wässerigem Medium tritt eine störende gelbrote Farbe auf. Alkohol erhöht dagegen die Empfindlichkeit.

Untere Nachweisgrenze = 0,06 γ Bor bzw. = 0,2 γ Borsäure. Ich hatte zwei immer frisch bereitete alkoholische Vergleichslösungen.

1. 20 mg% Borsäure = 0,2 mg je 1 ccm. In 1 Tropfen also 10 γ Borsäure.
2. 2 mg% Borsäure = 20 γ je 1 ccm. In 1 Tropfen also 1 γ Borsäure.

Zunächst untersuchte ich das destillierte Wasser auf Borfreiheit. 250 ccm destilliertes Wasser wurden in einer Platinschale verdampft und der Rückstand geglüht und in 1 ccm konz. H_2SO_4 aufgenommen, durch Asbest filtriert und nach obigem Verfahren auf Bor untersucht. Ebenso wurden 250 ccm bidestilliertes Wasser geprüft. Ich fand:

Im destillierten Wasser: 2,0 mg Trockenrückstand, 0,8 mg Glührückstand;

im bidestillierten Wasser: 0,8 mg Trockenrückstand, 0,4 mg Glührückstand.

Im Vergleich mit der Blindprobe und der Vergleichslösung II erhielt ich beim bidestillierten Wasser bei 5 Versuchen jedesmal ein negatives Ergebnis, beim destillierten Wasser viermal negative Proben und einmal eine ganz schwache Verfärbung, jedoch viel schwächer als bei der Vergleichs-

lösung II, bei der ich jedesmal einen deutlich blauen Farbumschlag erhielt. Das bidestillierte Wasser war also bestimmt als chemisch borfrei zu bezeichnen. Zieht man beim destillierten Wasser die untere Erfassungsgrenze der Chinalizarinprobe in Betracht, so sind im Höchstfall an Borsäure enthalten: 0,2 γ Borsäure in 1 Tropfen der schwefelsauren Lösung des Glührückstandes oder 4 γ in 250 ccm destilliertem Wasser = 0,0000016 % Borsäure. Man kann also auch das destillierte Wasser als chemisch borfrei bezeichnen. Ist es nun aber auch biologisch borfrei?

Nun untersuchte ich die gesamte *Mucor*-Nährlösung auf Verunreinigungen durch Bor. Gleichzeitig wollte ich sehen, ob das Jenaer 20er-Glas, das aus Borsilikaten besteht, Bor abgibt. In einer Quarzschale wurden 20 ccm der zweimal sterilisierten und 12 Tage im Kolben aus Jenaer Glas stehen gelassenen Nährlösung verdampft, verascht und stark geglüht. Der noch mit Kohlestäubchen verunreinigte Rückstand betrug 59 mg. Er wurde in 2 ccm H_2SO_4 aufgenommen und durch Asbest filtriert. Mit je 2 Tropfen dieser Lösung versuchte ich nun wieder im Vergleich mit einer Blindprobe und der Vergleichslösung II Bor nachzuweisen. Ich bekam bei acht Versuchen jedesmal eine negative Reaktion. Es waren also bei Beachtung der Empfindlichkeitsgrenze weniger als 4 γ je ccm oder auf 25 ccm Nährlösung umgerechnet weniger als 10 γ Borsäure, die durch Verunreinigungen der Ausgangschemikalien oder durch Abgabe des Glases kommen konnten. Die Nährlösung war demnach als borfrei zu bezeichnen. Um nun zu beweisen, daß die Borsäure sich während des Glühens nicht verflüchtigt und die Farbreaktion nicht durch einen anderen Stoff der Nährlösung gestört wurde (es stört eigentlich nur Nitrat, und das wird durch das Glühen vernichtet), untersuchte ich in genau der gleichen Weise 20 ccm der Nährlösung, die mit 0,5 % Borsäure versetzt war. Ich erhielt einen Glührückstand von 117 mg. In den 20 ccm Nährlösung waren 100 mg Borsäure enthalten, die beim Glühen in etwa 56,4 mg B_2O_3 übergeführt werden. Der übrige anorganische Rückstand betrug also auch hier 117 — 56,4 = 60,6 mg. Mit Chinalizarin bekam ich stark positive Reaktionen, weit stärker als die der herangezogenen Vergleichslösung I. Um auch hier nochmals die Empfindlichkeit der Reaktion zu prüfen, wurde eine Nährlösung mit 0,005 % Borsäure ebenso untersucht und ich konnte einwandfrei die Borsäure im aufgenommenen Glührückstand nachweisen. Dieser betrug hier 61,4 mg, wovon 0,564 mg B_2O_3 waren; das sind etwa 60,8 mg Glührückstand ohne B_2O_3.

Wird Borsäure ins Mycel aufgenommen und dort gespeichert? Ist Bor notwendig?

Mycel einer 17 Tage alten *Mucor pusillus*-Kultur, die auf einer Nährlösung mit 0,1 % Borsäurezusatz gewachsen war, wurde gut mit destilliertem Wasser ausgewaschen und getrocknet. 1,50 g des Trocken-

mycels veraschte ich in einer Quarzschale, glühte und nahm den Rückstand, der 27,0 mg betrug, in 2 ccm konz. H_2SO_4 auf, filtrierte durch Asbest und erhielt mit Chinalizarin eine stark positive Reaktion auf Bor. Die Farbe war kräftiger als die der Vergleichslösung I. Ins Pilzmycel wird also Borsäure aufgenommen. Nun untersuchte ich 1,00 g Trockenmycel einer ebenso alten *Mucor*-Kultur, die ohne Borsäurezusatz gewachsen war, nach dem gleichen Verfahren. Der Glührückstand betrug hier 16,4 mg. Die erhaltenen 2 ccm Untersuchungslösung verbrauchte ich nun zu 18 Versuchen. Davon waren drei negativ, vier nicht einwandfrei positiv, aber elf bestimmt positiv borhaltig. Mit einer Vergleichslösung schätzte ich auf etwa 12 γ Borsäure je 1 ccm. Der Pilz scheint also Borsäure nicht nur ins Mycel aufzunehmen, sondern sogar zu speichern.

Woher kommt nun die Borsäure? Wird sie aus dem Glas gezogen oder stammt sie doch aus der Nährlösung, die zwar chemisch, aber demnach nicht biologisch borfrei ist und Spuren von Bor enthalten könnte, die unter der Erfassungsgrenze der Chinalizarinprobe liegen und nun im Mycel so angereichert werden, daß man sie nachweisen kann? Die Nährlösung hat ja zwar 12 Tage ohne Pilz im Jenaer 20er-Glas gestanden und war dann noch borfrei. Aber unter den Veränderungen, die beim Wachsen des Pilzes vor sich gehen (p_H-Schwankungen), kann das Glas stärker beeinflußt werden und der Pilz dann Borsäure herausziehen. Um zu entscheiden, woher die Borsäure stammt, machte ich folgenden Versuch in Quarzkolben (Tabelle XV).

Tabelle XV.

Kolben	% Borsäure	mg Mycel	Mittel	Verascht	mg Glührückstand	Ergebnis
1	0	—	-	20 ccm Nährlösung	64,0	borfrei
2	0	474	490	980 mg Mycel	15,8	borfrei!
3	0	506				
4	0,01	734	721	1000 mg Mycel	17,2	borhaltig
5	0,01	707				

Nährlösung wie in Tabelle IX.

Nr. 1 blieb ohne Impfung, Nr. 2 bis 5 wurde mit *Mucor pusillus* beimpft, 10 Tage wachsen gelassen und geerntet. Dann wurde die oben angegebene Menge verascht und der Glührückstand auf Bor untersucht. Der Versuch zeigt, daß das Bor aus dem Glase stammt und nicht aus der Nährlösung. Allerdings gibt das Glas auch bei längerem Stehen nicht das Bor an die Nährlösung ab, sondern Bor gelangt erst durch Einwirkungen des Pilzes beim Wachstum ins Pilzmycel. Außerdem macht sich einwandfrei eine fördernde Wirkung von kleinen Bor-

mengen bemerkbar. Auch ein zweiter Versuch in Quarzkolben, den ich zur Bestätigung dieses Ergebnisses ansetzte, hatte das gleiche Ergebnis (Tabelle XVI).

Tabelle XVI. Versuch II in Quarzkolben mit *Mucor pusillus*.

% Borsäure	mg Mycel			Mittel
0	1. 668	2. 812	3. 752	744
0,01	4. 855	5. 815	6. 840	837
0,001	7. 870	8. 870	9. 873	871

Auch hier sehen wir die fördernde Wirkung des Bors. Man ersieht, daß die Optimalkonzentration von Bor bei *Mucor pusillus* bei etwa 0,001 % liegt. Jedenfalls zeigt das Schwanken der Parallelen 1 bis 3, daß die Nährlösung noch nicht optimal ist, andererseits ist das Wachstum bei 0,01 % schon wieder etwas geringer und auch die Schwankungen der drei Parallelen größer. Da ich mir bei dem hohen Ergebnis von Nr. 2 nicht sicher war, ob nicht eine Spur von Bor hineingekommen sein könnte und dadurch eine Förderung eingetreten wäre, untersuchte ich bei Nr. 1 und 2 den Glührückstand des Mycels auf Bor. Ich erhielt bei beiden bornegative Reaktionen. Es kann also gesagt werden, daß Bor für *Mucor pusillus* nicht absolut lebensnotwendig ist, sondern nur in kleinsten Mengen (unter 0,001 %) unter den gegebenen Versuchsbedingungen etwas fördert. Diese Konzentration wird aber bei Versuchen in Glaskolben schon durch Abgabe von Bor während des Pilzwachstums gedeckt, und daher ist bei gewöhnlichem Glas eine fördernde Wirkung von kleinen Bormengen nicht mit Sicherheit zu erkennen.

Besprechung der Ergebnisse.

Zunächst ist ein Wort über die Bedeutung des Zeitfaktors zu sagen: Es ist bekannt, daß die Versuche bei einem Objekt ganz verschieden ausfallen können, je nach dem Zeitpunkt der Ernte [vgl. *A. Rippel* (3)]. Wenn sich dadurch nun auch Verschiebungen hinsichtlich des Ausfalls der einzelnen Versuche beim gleichen Pilz ergeben könnten, worauf S. 336 aufmerksam gemacht wurde (obwohl das in diesem Falle offenbar nicht entscheidend war), so zeigten doch z. B. die dort mitgeteilten Versuche an *Mucor pusillus* deutlich, daß dadurch keine *grundsätzliche* Änderung der beobachteten Erscheinungen zu erwarten ist. Aber selbst bei vorübergehender Wirkung würde das tatsächliche Vorhandensein nicht beseitigt. Gleichwohl wäre dieser Frage bei weiteren Untersuchungen Aufmerksamkeit zu schenken; im Rahmen der vorliegenden war es nicht mehr möglich und auch nicht erforderlich, den Zeitfaktor eingehender zu berücksichtigen.

Wir betrachten nun die *Empfindlichkeit der geprüften Pilze gegen die verwendeten Stoffe.* Es ist allerdings nicht möglich, hierüber etwas allgemein Gültiges auszusagen, wobei vor allem zu berücksichtigen ist, daß nur wenig Pilzarten zum Vergleich zur Verfügung standen. Schon bei der gleichen Art wechseln, wie wir gesehen haben, die Schwellenwerte der Schädigungen und sind zudem, wie das Beipsiel von *Mucor pusillus* (S. 344) zeigt, stark von den Kulturbedingungen abhängig, indem bei diesem Pilz Erhöhung der Eisensulfatgabe die Resistenz gegen Borsäure außerordentlich steigerte, die gegen Magnesiumsulfat etwas herabdrückte. Immerhin aber sind unsere Kulturbedingungen nicht so verschieden, daß nicht gewisse Unterschiede, die hervortreten, als wirklich bestehend angenommen werden können.

Tabelle XVII zeigt das Ergebnis der aus allen Versuchen gewonnenen Zusammenstellung, wobei zunächst nur die linke Seite in Frage kommt. Die Schwellenwerte sind so ermittelt, daß sie für eine Schädigung von 25% des Ertrages festgestellt wurden. Beim Vorhandensein mehrerer Versuche wurde die stärkste Schädigung gewählt. Das ist zwar alles recht willkürlich, aber es handelt sich hier ja nur um eine grobe qualitative Ordnung.

Tabelle XVII. Giftwirkung und Antagonismus von Magnesiumsulfat, Sublimat und Borsäure bei verschiedenen Pilzen.

Pilz	Schädigungsgrenze durch			Behebung der Schädigung von			
	$MgSO_4$ g auf 100 ccm	$HgCl_2$ mg%	Borsäure %	Mg durch Hg	Mg durch B	Hg durch Mg	B durch Mg
Aspergillus niger	28	5—10	0,8	+	+	+	+
Aspergillus flavus	40	5—10	0,5	+	+	+	+
Fusarium coeruleum	20	2,5	0,1	+	0	+	0
Absidia cylindrospora	20	nicht gepr.	0,05	nicht gepr.	+?	nicht gepr.	+
Mucorinee unbest.	12	„ „	0,15 *	„ „	0	„ „	0
Mucor pusillus	4	40	0,3	+	+?	+	+?
Cunninghamella elegans	4	10	0,05	0	+?	0	0
Rhizopus nigricans	2	nicht gepr.	0,1	nicht gepr.	+	nicht gepr.	+?
Penicillium glaucum	4	„ „	0,05	„ „	+	„ „	+

* Bei dem in Tabelle XI angeführten Versuch 0,2; der obige Wert aus dem nicht mitgeteilten Versuch.

Die beiden *Aspergillus*-Arten, *niger* und *flavus*, zeichnen sich offenbar durch eine besondere Resistenz gegen Magnesiumsulfat aus; die Werte für die *Mucorineen* liegen alle darunter, zeigen aber unter sich große Unterschiede. *Penicillium glaucum* steht hingegen weit unter den *Aspergillus*-Arten.

Eine nähere Betrachtung zeigt indessen, daß diese Verschiedenheit in der Resistenz offenbar nur eine scheinbare ist: In Abb. 4 sind die Werte für alle Versuche eingetragen, in denen Magnesiumsulfat zur Verwendung kam, und zwar einmal (ausgezogene Linie) für *Aspergillus niger* + *flavus*, die wegen ihres gleichen Verhaltens zusammengenommen werden konnten, und sodann (gestrichelte Linie) für *Mucor pusillus*. Der Kontrollwert eines jeden Versuches wurde dabei = 100 gesetzt und die übrigen Werte darauf bezogen. Für jede $MgSO_4$-Konzentration wurde das Mittel gebildet. Man sieht deutlich, daß der Ertragsabfall für höhere $MgSO_4$-Gaben bei *Mucor* durchaus nicht stärker ist als bei *Aspergillus*, eher geringer. Das kann aber nur bedeuten, daß die größere Resistenz von *Aspergillus* dadurch vorgetäuscht wird, daß hier die ersten der höheren $MgSO_4$-Gaben eine fördernde Wirkung haben, wie schon oben festgestellt wurde. Dadurch tritt die bei *Mucor* von Beginn an einsetzende Schädigung bei *Aspergillus* erst später ein, und so wird die größere Resistenz vorgetäuscht. Wenn auch weitere Versuche eine Bestätigung bringen müßten, so scheint mir das Gesagte doch aus den Kurven eindeutig hervorzugehen.

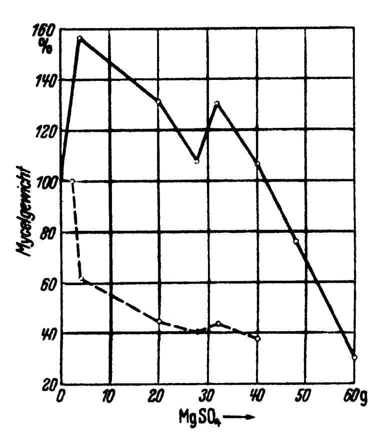


Abb. 4. Wirkung einer Magnesiumsulfatkonzentration.
——— *Aspergillus niger* + *flavus*
- - - - - *Mucor pusillus*.

Die beiden *Aspergillus*-Arten sind auch gegen Sublimat sehr resistent, ganz besonders aber *Mucor pusillus*, der erst durch Mengen über 20 mg% geschädigt wird[1]. Da dieser Pilz aber eine recht niedrige Schädigungsgrenze dem Magnesiumsulfat gegenüber hat (wobei zunächst von der soeben vorgenommenen Betrachtung der Resistenz abgesehen sei) und in 7 von 8 Versuchen bereits durch 4 g $MgSO_4$ zu 100 ccm

---

[1] Es erscheint nicht ausgeschlossen, daß man durch entsprechende Sublimatgaben eine Elektiv-Nährlösung für diesen Pilz herstellen könnte, die seine Isolierung aus dem Boden ebenso einfach gestattet, wie hohe Konzentrationen von Tannin die Isolierung von *Aspergillus niger* [vgl. *A. Rippel* (2)].

Nährlösung geschädigt wird, so geht offenbar Resistenz gegen Magnesiumsulfat und gegen Sublimat nicht parallel. Sie verläuft jedoch auch nicht gegensinnig. Man könnte ja, in Hinblick auf die beobachteten antagonistischen Erscheinungen, annehmen, daß hohe Magnesiumsulfatresistenz niedriger Resistenz gegen Sublimat entspräche und umgekehrt. Aber *Fusarium* steht hinsichtlich seiner $MgSO_4$-Resistenz deutlich über *Mucor* und *Cunninghamella*, bei niedriger Sublimatresistenz, in beiden Hinsichten aber unter der *Aspergillus*-Arten.

Weniger klar liegen die Verhältnisse bei der Borsäure. Es könnte fast scheinen, daß größere Resistenz gegen Magnesiumsulfat auch größere Resistenz gegen Borsäure bedinge. Aber *Absidia* verhält sich in dieser Hinsicht ganz anders als *Mucor pusillus*: verhältnismäßig hohe Resistenz gegen Magnesiumsulfat, sehr geringe gegen Borsäure, bei *Mucor* umgekehrt. Auch *Fusarium* könnte noch zu diesem Vergleich herangezogen werden.

Aber alle diese Betrachtungen leiden an zu großer Unsicherheit, als daß sie als etwas Feststehendes angenommen werden könnten, wie sich aus der oben gegebenen Erörterung im Abschluß an die Kurven der Abb. 4 ergibt. Was hier hinsichtlich der Resistenz gegen hohe Gaben von Magnesiumsulfat festgestellt wurde, würde sinngemäß auch hinsichtlich der Sublimat- und Borsäureresistenz gelten können, zumal diese beiden Stoffe wie hohe Gaben von Magnesiumsulfat ebenfalls fördernde Wirkungen zeigen können, bevor die Schädigung durch höhere Konzentrationen einsetzt. Eine Prüfung der vorliegenden Ergebnisse zeigte mir aber, daß die vorhandenen Zahlen kaum ausreichen, diese Frage weiter zu erörtern. Es kann daher lediglich auf die mögliche Schwierigkeit hingewiesen werden.

Die von mir beobachtete Verschiedenheit in der Resistenz der einzelnen Pilze bestätigt die mannigfachen Angaben in der Literatur. Für die Widerstandsfähigkeit von Mikroorganismen gegen Quecksilbersalze bzw. über deren hemmende und desinfizierende Wirkung liegen zahlreiche Angaben, insbesondere von pflanzenpathologischer Seite sowie von seiten der Hygieniker vor, auf deren Aufzählung hier verzichtet werden kann. Hinsichtlich einiger Angaben sei auf *Czapek* (Bd. I, S. 187) verwiesen. Es sei nur erwähnt, daß sich nach *Kattermann* auch die einzelnen Rassen der *Knöllchenbakterien* verschieden resistent gegen Sublimat verhalten. *K. Rippel* fand die tödliche Wirkung von Sublimat auf 5 Pilze im Extremfall siebenmal so hoch, *Clark* für *Penicillium* achtmal höher als für *Botrytis* (für Silbernitrat hingegen fünfmal niedriger), während *K. Rippel* für *Penicillium* eine geringere Resistenz fand als für *Botrytis* und zudem die Reihenfolge der Wirkung für Silbernitrat gleich fand der für Sublimat. Diese wenigen Beispiele mögen nur zeigen, daß es vorerst keinen Zweck hat, eine genaue Aufstellung von Mikroorganismen hinsichtlich ihrer Resistenz zu geben, um so mehr, als die vorliegenden Versuche ja gezeigt haben, in welch hohem Maße die Wirkung eines Stoffes von den sonstigen Bedingungen der Nährlösung abhängt. Mehr als die qualitative Angabe der

zwischen den einzelnen Mikroorganismen bestehenden Verschiedenheit unter den gleichen Bedingungen läßt sich vorerst noch nicht machen.

Hinsichtlich der erheblich weniger giftigen Borsäure liegen die Dinge ähnlich; es sei insbesondere auf die Angabe von *Luchetti* hingewiesen, der aus boraxhaltiger Erde von Larterello ein *Cephalosporium* isolierte, das noch in einer Lösung von 10 % Natriumborat + 12,5 % Borsäure wuchs, der ferner *Micrococcus aurantiacus* und *Bacillus sphaericus* als ausgesprochen borliebend fand, während *Actinomyceten* viel empfindlicher waren als *Bakterien* und *Pilze*, sowie auf die Angabe von *Schnegg* und *Weigand*, wonach rote *Torula*-Arten, *schwarze Hefen* und *Dematium*, die sich in käuflicher 3 %iger Borsäure finden, besondere Resistenz gegen diese Verbindung zeigen. *Rubentschik* stellte in borsäurehaltigen Schlammvulkanen anaerobe und fakultativ anaerobe *Bakterien* fest mit besonderer Resistenz gegen Bor. Nach *Blair* wirkt Borsäure stark selektiv auf *Bakterien*. Die Angaben von *Boeseken* und *Waterman*, daß *Penicillium glaucum* durch 0,06 % Borsäure, *Aspergillus niger* erst durch 0,5 bis 1,0 % gehemmt werde, stimmen mit meinem Befund überein, während nach *Schmucker* ein grünes *Penicillium* noch über 1 % Borsäure verträgt, *Phycomyces Blakesleeanus* dagegen schon bei 0,05 % nicht mehr wächst, eine Zahl, die noch niedriger liegt als die Werte bei den von mir geprüften *Mucorineen*. Im übrigen kann auch hinsichtlich der Borsäure auf die Wiedergabe der mannigfachen Angaben über die meist nur geringe desinfizierende Wirkung verzichtet werden.

Daß bei der Verschiedenheit der einzelnen Mikroorganismen auch die Resistenz gegen Sublimat und Borsäure keine Beziehung zeigt, liegt auf der Hand und ergibt sich z. B. beim Vergleich zwischen *Cunninghamella* und den beiden *Aspergillus*-Arten. Nur sehr ausgedehnte Untersuchungen an einer großen Anzahl von Pilzen könnten Klarheit darüber schaffen, ob bzw. bis zu welchem Grade sich vielleicht doch noch gewisse Beziehungen würden auffinden lassen.

Da *A. Rippel* und *Keseling*, ebenso *Stapp* und *Bortels* [vgl. weiter *A. Rippel* (2)] fanden, daß *Mucorineen* gegen Tannin empfindlich sind, andererseits aber nach *A. Rippel* und *Stoess* Tannin antagonistisch die Schädigungen durch Magnesiumsulfat beheben kann, wie es in den vorliegenden Untersuchungen auch für das *Sublimat* zutrifft, so hätte man erwarten können, daß *Mucorineen* auch gegen Sublimat empfindlich wären, was aber, wie man sieht, durchaus nicht der Fall ist. Bei Einbeziehung des Verhaltens gegen Tannin finden wir also die gleichen undurchsichtigen Verhältnisse, wie wir sie oben für Magnesiumsulfat, Sublimat und Borsäure besprochen haben. Wir können, wie schon gesagt, diese Mannigfaltigkeit gewissen Stoffen gegenüber vorerst nur registrieren, möchten dazu aber bemerken, daß sie ein deutlicher Hinweis darauf sind, wie vorsichtig man bei Deutungen sein muß, wie sie etwa *Boas* in seinem „phyletischen Anionenphänomen" versuchte.

Auch der *Antagonismus* zeigt ein sehr uneinheitliches Bild. Bei *Fusarium* ist er zwischen Magnesiumsulfat und Sublimat eindeutig

vorhanden, hingegen deutlich nicht zwischen jenem und Borsäure. Ähnliches gilt für *Cunninghamella*, allerdings umgekehrt, nicht zwischen Magnesiumsulfat und Sublimat, hingegen zwischen jenem und Borsäure. Zwar ist der Erfolg in diesem Falle, nach Aussage von Tabelle XI, nur sehr schwach. Auch bei der unbestimmten *Mucorinee* zeigte sich kein Magnesiumsulfat-Borsäure-Antagonismus. Bei *Mucor pusillus* ist dieser Antagonismus schwankend, also wohl schwach ausgebildet, stark jedoch der Magnesiumsulfat-Sublimat-Antagonismus. Bei den beiden *Aspergillus*-Arten sind beide gut ausgeprägt.

Daß im übrigen der Antagonismus sich sowohl hinsichtlich des Magnesiumsulfats auf Sublimat bzw. Borsäure wie auch umgekehrt bemerkbar macht, ist selbstverständlich. Wenn hierbei das Magnesiumsulfat als Antagonist insofern stärker in Erscheinung tritt, als wir in Tabelle II/III und X gesehen haben, daß auch die absolut hemmende Gabe der beiden anderen Stoffe aufgehoben werden kann, was umgekehrt nicht der Fall war, so dürfte der Grund rein äußerlich sein: Namentlich Sublimat hat eine recht scharfe Giftgrenze, die leicht die Erfassung dieses Antagonismus ermöglicht, während Magnesiumsulfat eine weite Spanne besitzt, innerhalb deren noch Wachstum des Pilzes möglich ist, wenn auch schon erhebliche Schädigung eingetreten ist. Da es uns nur auf die Erfassung der schädlichen Wirkung ankam, ist uns aus diesem Grunde die Erfassung der absolut hemmenden Dosis von Magnesiumsulfat entgangen bzw. sie ist nicht vorhanden, da 60 g $MgSO_4$ zu 100 ccm Nährlösung, wie sie bei *Aspergillus flavus* angewendet wurden, bereits etwa eine gesättigte Lösung darstellen. Möglicherweise würde man mit Lithium an Stelle von Magnesiumsalzen weiter kommen können. Daß also die Dinge nicht anders liegen dürften als umgekehrt, kann wohl angenommen werden.

Die Verschiedenheit der antagonistischen Wirkung sowohl für einen Pilz und die beiden Giftstoffe wie auch für die verschiedenen Pilze einem Giftstoff gegenüber vervollständigt das Bild der Uneinheitlichkeit, das sich schon für die reine Giftwirkung selbst ergab. Hieraus kann eine Folgerung gezogen werden: Wenn wir ursprünglich von dem Gedanken ausgingen, daß wir als Antagonisten gegen Magnesiumsulfat mit seiner auflockernden Wirkung Stoffe wählten, denen wir entsprechend dem Calcium, Strontium und Tannin eine verdichtende oder gerbende Wirkung zusprechen konnten, so ist doch offenbar eine allgemeine Deutung auf dieser Basis nicht möglich. Zwar dürfte die *Grundwirkung* darin zu suchen sein. Aber die Verschiedenheit im einzelnen, die wir oben besprochen haben, zeigt, daß offenbar für jeden Stoff und für jeden Pilz wieder Besonderheiten vorliegen müssen. Das geht weiter daraus hervor, daß, wie wir S. 349 gesehen haben, auch als gleichartig wirkend angenommene Stoffe, Sublimat und Borsäure, als gegenseitige An-

tagonisten auftreten können. Wir werden nicht fehl gehen in der Annahme, daß die Zelle vermöge ihrer spezifischen Struktur auf jeden Stoff mit einer verschiedenen Reaktion auf die Störung des Gleichgewichtes antwortet, die bei seinem Hinzufügen eintritt. Welcher Art diese jeweils ist, kann hier natürlich nicht entschieden werden. Es war hier nur die Aufgabe, die Wirkungen festzustellen und den Kreis der gegen Magnesiumsulfat wirksamen antagonistischen Stoffe, von denen *A. Rippel* und *Stoess* Calcium, Strontium und Tannin als wirksam gefunden hatten, zu erweitern. Daher soll auch auf eine Besprechung verzichtet werden, wie man sich im einzelnen die Wirkung der untersuchten Stoffe vorzustellen habe. Ebenso kann auf ein Eingehen auf die mannigfachen sonstigen antagonistischen Erscheinungen verzichtet werden, bei denen es sich im wesentlichen um Prüfung von Salzen handelt, mit denen der Organismus „normalerweise“ (vgl. unten S. 365) in Berührung kommen kann (ausbalanzierte Lösungen).

Hier mögen noch einige Angaben aus der Literatur Platz finden, die zeigen *könnten*, daß ähnliche antagonistische Beeinflussungen vorliegen, wie sie hier beobachtet wurden: In erster Linie sind die Versuche von *Schmucker* zu nennen, nach denen die Keimung tropischer *Nymphaeaceen*-Pollen erst durch Gegenwart von Bor ermöglicht wird, das das Platzen der Pollen verhindert. Nach *Löhnis* sind die äußeren Symptome des Bormangels bei höheren Pflanzen die gleichen wie die des Calciummangels, und *Kisch* gibt an, daß bei *normalem* tierischen Gewebe (nicht bei Sarkom) die bei Calciummangel eingetretene Herabsetzung der Atmung durch Bor (oder Aluminium) wieder in eine Steigerung übergeht. Nach *Rehm* wirkt bei *Impatiens* Bor nur in schwach saurer Nährlösung günstig, ebenso nach *Pirschle* bei *Aspergillus niger*; demnach kann Bor die Hydroxylionen ersetzen. Nach *Martin* und *Fowler* wirkt Sublimat verstärkend auf die abtötende Wirkung von Tannin bei einigen *Bakterien*, was bei der gleichartig gerbenden Wirkung verständlich wäre.

Nun muß noch auf einen weiteren Punkt eingegangen werden: Die antagonistische Wirkung von Magnesiumsulfat dem Sublimat gegenüber könnte vielleicht als reine Salzwirkung in der Nährlösung gedeutet werden. Es könnte nämlich die Ionisation des Sublimats zurückgedrängt und so die Giftwirkung der Hg-Ionen vermindert werden, denen man seit *Paul* und *Krönig* die eigentlich desinfizierende Wirkung zuschreibt. Indessen ist diese Ansicht nicht unwidersprochen geblieben, indem viele Autoren den undissoziierten Anteil bzw. Komplexionen für wirksam halten (*Clark*, *Pulst*, *Heubner*, *Seth* und Mitarbeiter). Oder man könnte an die Entstehung von Komplexsalzen oder schwer löslichen basischen Quecksilberverbindungen unter der Wirkung von Magnesiumsulfat denken. Dissoziationsgrad, Salzhydrolyse, Komplexionen, kolloide Lösungen usw. sind ja, wie *Pirschle* hervorhebt, wichtige Momente bei der Wirkung eines Salzes.

Aber es ist wohl nicht möglich, die umgekehrte Erscheinung, also die antagonistische Wirkung des Sublimats einer schädlichen Wirkung von Magnesiumsulfat gegenüber auf gleiche Weise zu erklären. Wenn z. B. nach Tabelle II, Versuch 3 bei *Aspergillus flavus* die Schädigung durch 60 g Magnesiumsulfat auf 100 ccm Nährlösung durch 5 mg% Sublimat stark behoben wird (Steigen der Ernte von 38 auf 118 mg), so bleibt nur der Schluß übrig, daß es sich um einen *physiologisch*-chemischen Antagonismus handelt, der sich nicht in der Nährlösung abspielt, sondern der irgendwo und irgendwie an dem Organismus selbst ansetzt. In derartigen Erscheinungen müssen wir wohl die Hauptursache für den beobachteten Antagonismus sehen, unbeschadet des selbstverständlichen Vorhandenseins eines rein chemischen Antagonismus in der Nährlösung. Von solchen Erwägungen aus wurden ja auch die geschilderten Versuche unternommen, wenn sie auch, wie schon erwähnt, nur als ganz grobe Vorstellungen zu werten sind.

Weiterhin wäre hier noch die Frage zu erörtern, wie weit den verwendeten Stoffen der *Charakter eines notwendigen Nährstoffes* zuzusprechen ist. Zwar handelt es sich bei den Erscheinungen, die wir besprochen haben, zweifellos um antagonistische Wirkungen; aber die Nährstoffwirkung muß noch in Betracht gezogen werden. Für das Magnesiumsulfat muß natürlich eine eigentliche Nährstoffwirkung angenommen werden. Die hohen Gaben von Magnesiumsulfat liegen indessen weit über der Grenze des Normalbedarfs des Organismus an dem Nährstoff Magnesium. Wenn also auch hier, wie z. B. bei *Aspergillus niger* (Tabelle I, VI) und *Asp. flavus* (Tabelle II, VII) vielfach eine Steigerung der Ernte durch hohe $MgSO_4$-Gaben allein erfolgte, so wird diese Wirkung nicht als eine Wirkung des Nährstoffs Magnesium anzusprechen sein, sondern anders. Dieses Salz kann natürlich auch in der ohne Sublimat oder Borsäure verbliebenen Nährlösung eine antagonistische oder sonstwie fördernde Wirkung entfalten, wobei auch der Sulfatanteil wirksam sein kann. Das ist um so mehr anzunehmen, als z. B. in Tabelle I, Versuch 1 bei *Aspergillus niger* die Wirkung bei 40 g Magnesiumsulfat auf 100 ccm Nährlösung noch höher ist als bei 32 g (646 gegen 532 mg Ernte bei 425 mg in der Kontrolle). Auf diese Weise erklärt sich offenbar auch, wie oben, S. 356 ausgeführt wurde, die scheinbar verschiedene Resistenz der beiden *Aspergillus*-Arten und von *Mucor pusillus* gegenüber Magnesiumsulfat. Auch das oben hervorgehobene wechselnde Verhalten bei den einzelnen Versuchen mit dem gleichen Pilz deutet auf das Vorliegen besonderer Erscheinungen hin, die sich kaum durch eine eigentliche Nährstoffwirkung erklären lassen. Aber, wie gesagt, die tatsächlichen antagonistischen Wirkungen sind davon unabhängig.

Hier sei noch kurz auf einen Punkt hingewiesen: Oben (S. 336, 340, 347) wurde öfters festgestellt, daß die antagonistische Wirkung Ernten brachte, die noch über dem Kontrollwert und den durch Magnesiumsulfat erzielbaren Erntesteigerungen lagen. Diese Erscheinung ist wohl so zu deuten, daß hier durch weitere Staffelung der hohen Magnesiumsulfatgaben die gleiche Erntesteigerung zu erzielen gewesen wäre. Die Zugabe von Sublimat oder Borsäure bringt dann also eine Wirkung, wie sie der einer Magnesiumsulfatgabe entsprechen würde, die etwas unter der bereits schädlichen hohen Gabe liegt.

Wie steht es nun mit dem Sublimat. Abb. 1 zeigt einwandfrei eine Wirkung auf die Sporenbildung von *Aspergillus niger*, jedoch ohne Wirkung auf die Ernte, die der Kontrolle gegenüber verringert ist. Da jedoch die Sporenbildung bei diesem Pilz durchaus nicht abhängig ist von der Zufügung von Sublimat zur Nährlösung, so wird man, wie oben ausgeführt wurde, kaum eine lebensnotwendige Wirkung des Sublimats darin erblicken können, sondern Vorgänge besonderer, noch unbekannter Art und indirekter Natur, sofern man nicht die Annahme macht, daß in allen Versuchen, in denen es zur Sporenbildung bei diesem Pilz kommt, genügend Spuren von Quecksilber vorhanden sind. Da der Pilz die Nährlösung stark säuert, bei saurer Reaktion aber die Sporenbildung zurückgedrängt wird, so könnte man, ähnlich wie es oben für die Borsäure angegeben wurde, an einen Ersatz der Hydroxylionen durch Quecksilber denken. Leider war es mir nicht möglich, diese Frage weiter zu verfolgen.

Im übrigen hat Sublimat, wie oben erwähnt wurde, zweifellos in manchen Fällen bei der normalen, geringen Gabe von Magnesiumsulfat eine Ertragsteigerung bewirkt. Hiervon auf die Notwendigkeit des Quecksilbers zu schließen, wäre aber zum wenigsten übereilt. Meine Versuche haben ja gerade gezeigt, welche große Wirkungen unter besonderer Zusammensetzung der Nährlösung durch Sublimat entfaltet werden können, Wirkungen, die natürlich auch in abgeschwächtem Maße in der „normalen" Nährlösung vorhanden sein können und wie sie sich ja auch beim Magnesiumsulfat unabhängig von der eigentlichen Nährstoffwirkung finden, wie oben S. 361 ausgeführt wurde.

Die Angaben über eine günstige Wirkung von Quecksilber bzw. von Sublimat in der Literatur sind etwas uneinheitlich. *Schulz* hatte, gemessen an der Bildung von Kohlensäure durch *Hefe* eine günstige Wirkung festgestellt; doch wurden diese Versuche, die u. a. zur Aufstellung des *Arndt*schen Gesetzes (kleinste Mengen eines Giftes fördern, größere wirken narkotisch bzw. hemmend, noch größere tödlich) geführt hatten, stark kritisiert, und z. B. von *Joachimoglu, Meier, Zeller* wurde der Befund in Abrede gestellt. Trotz der Berechtigung einer solchen Kritik wird man indessen den Beweis für das Nichtvorhandensein einer Förderung keineswegs als erbracht sehen, da die vorliegenden Versuche ja einwandfrei eine

Sublimatwirkung zeigen und die Bedeutung der Kulturbedingungen herausstellen. Eine fördernde Wirkung wurde denn auch vielfach beobachtet: *Biernacki* (Beschleunigung der Alkoholgärung der Hefe), *Duclaux* sowie *Richet* (Beschleunigung der Milchsäuregärung), *Hüne* (Förderung von *Bacterium coli*), *Kitawin* (fördert Trockengewichtsbildung und Citronensäurebildung von *Aspergillus niger*). *Bortels* (jedoch nur in einem Falle) sowie *Butkewitsch* und *Orlow*, ferner *Lohmann*, ebenso *Pirschle*, fanden Förderung der Trockengewichtsbildung von *Aspergillus niger* für Sublimat in geringem Maße, dieser etwas stärkere durch Kalomel. Die Notwendigkeit von Quecksilber als Nährstoff wurde noch nicht behauptet.

Was das Bor betrifft, so haben die S. 353f erwähnten Versuche mit *Mucor pusillus* wohl einwandfrei gezeigt, daß es zwar fördert (in einer „normalen" Nährlösung), aber doch von einer Notwendigkeit keine Rede sein kann. Auch hier können natürlich, wie bei hohen Gaben von Magnesiumsulfat und bei geringen Gaben von Sublimat sich schon die bescheidenen antagonistischen Förderungen auch in der normalen Nährlösung abspielen, die unter besonderen Bedingungen die oben geschilderten großen Ausmaße annehmen können. Die Tatsache, daß in den Versuchen von *Pirschle* Bor nur in saurer Lösung förderte, spricht ebenfalls nicht für eine unbedingte Lebensnotwendigkeit.

Es kann daher auch die Angabe von *Davis* und Mitarbeitern, wonach Bor lebensnotwendig für *Dothiorella spec.* sein soll, noch nicht ohne weiteres anerkannt werden. Über Begünstigung des Wachstums von *Penicillium expansum* und von *Trichoderma Koningi* berichtet *Niethammer*. *Cusumano* gibt Förderung von *Aspergillus* an, *Verona* Förderung der Nitratbildung (bis etwa 0,1 % wird Ammoniumborat gut nitrifiziert), *Niculescu* Förderung der Essigsäuregärung. Auch die Angaben von *Luchetti* können hier herangezogen werden.

Es liegen somit weder für Quecksilber noch für Bor Angaben vor, aus denen man mit Sicherheit eine Lebensnotwendigkeit der beiden Elemente für Mikroorganismen schließen könnte. Andererseits haben meine Versuche gezeigt, daß unter besonderen Bedingungen durch diese beiden Elemente bzw. der verwendeten Verbindungen Wirkungen erzielt werden können, die solche Ausmaße erreichen, daß man versucht wäre, den Schluß auf die Lebensnotwendigkeit zu ziehen. Denn bei *Aspergillus flavus* stieg die Ernte bei Magnesiumsulfatschädigung durch Sublimat im höchsten Falle (Tabelle II, Versuch 3) immerhin auf das 3,1fache, durch Borsäure (Tabelle VII, Versuch 3) auf das 2,3fache. Wie oben S. 359 ausgeführt wurde, liegt es offenbar einfach an der geringen Schädlichkeit sehr hoher Magnesiumsulfatgaben, daß ich hier nicht weitergekommen bin, und es ist zu erwarten, daß man mit anderen Stoffen auch größere Erfolge haben wird. Indessen handelt es sich zweifellos um antagonistische Erscheinungen, die nur unter den besonderen Bedingungen der hohen, schädlichen Gaben von Magnesiumsulfat diese Wirkung entfalten. Jedenfalls aber zwingen diese Betrach-

tungen zu einer näheren Erörterung dessen, was nun eigentlich als ein „Nährstoff" bzw. als ein „Giftstoff" zu bezeichnen ist.

Die vorliegenden Versuche bestätigen und erweitern bzw. ergänzen die Feststellungen von *Lohmann*[1]. Es seien die einzelnen Punkte kurz zusammengestellt: Wir haben hier einmal die Erfüllung der O-Bedingung des Ertragsgesetzes [vgl. *A. Rippel* (3)] durch Giftstoffe (völlige Aufhebung der Sublimat- oder Borsäurehemmung durch schädliche Magnesiumsulfatgaben). Wir sehen ferner eine außerordentlich starke Sublimat- (und Borsäure-) Wirkung, die im Maximum das 3,1fache des Wertes der Kontrollernte bringt; somit ist die Wirkung ohne das Gift ganz erheblich weiter an die O-Bedingung herangerückt, als *Lohmann* bei seinen Versuchen fand, und das Vorhandensein dieser O-Bedingung ist im Gegensatz zur Annahme von *Lohmann* durchaus nicht mehr so zweifelhaft, da es offenbar, wie oben S. 359 ausgeführt wurde, lediglich an der geringen Schädlichkeit hoher Magnesiumsulfatgaben lag, daß die O-Bedingung hier nicht zu erreichen war. Wir haben endlich, wie verschiedentlich hervorgehoben wurde (S. 332, 334, 340, 342), eine abgestufte Wirkung der geprüften Giftstoffe bei ihrer fördernden Wirkung und finden auch bei der Giftwirkung das von *Lohmann* beobachtete Vorhandensein eines Wendepunktes wieder (vgl. die *Mucor*-Kurve in Abb. 4). Im übrigen sind weitere Ausführungen hierzu an anderer Stelle (*Rippel* und *Lohrmann*) gegeben, so daß ich mich hier auf kurze Feststellungen beschränken kann.

Der Begriff „Nährstoff" ist danach durch den Begriff „Nährstoff*wirkung*" zu ersetzen, wie schon *Czapek* (Bd. I, S. 150) und *Lohmann* betonen; entsprechend würde man nicht von „Gift", sondern von „Gift*wirkung*" sprechen. Beides, Nährstoffwirkung und Giftwirkung, sind grundsätzlich nicht voneinander zu trennen. Denn jeder Stoff, der den Organismus in irgendeiner Weise physiologisch beeinflußt, vermag diese Wirkung, je nach den vorliegenden Bedingungen, in positivem oder negativem Sinne auszuüben. Man kann auch die Lebensnotwendigkeit eines Stoffes oder Elementes nicht danach bemessen, ob er unmittelbar in einen organischen Bestandteil des Organismus eingebaut wird; denn dies ist nicht einmal von dem in so großen Mengen benötigten Kalium bekannt und gilt z. B. auch nicht für wenigstens einen Teil der Phosphorsäure, soweit dieser bei der Phosphorylierung nur eine vorübergehende katalytische Rolle spielt.

[1] Es sei hier noch auf die von *Lohmann* übersehene Arbeit von *Waterman* (2) verwiesen, wonach Phenol und ähnliche Verbindungen für *Penicillium glaucum* offenbar weit bessere Kohlenstoffquellen sind als für *Aspergillus niger*, so daß dieser Autor für das Phenol zu weit eindrucksvolleren Ertrags- und Giftkurven gelangte als *Lohmann*.

Hingegen muß die Nährstoffwirkung (bzw. der Begriff Nährstoff) erheblich erweitert werden, wenn wir nach der *ökologischen Bedeutung* fragen. Es ist bekannt, daß unsere Nährlösungen weit davon entfernt sind, „normale" Lebensbedingungen zu bieten. So erscheint es durchaus möglich, daß in der Natur hier und da Stoffe als ökologische Faktoren bedingend für das Vorkommen besonderer Typen auftreten, wie wir es von der Konzentration der Wasserstoffionen, dem Kochsalz usw. kennen. Das Bor z. B. könnte in dieser Hinsicht einen ökologisch wirksamen Faktor bilden, wie die oben erwähnten Angaben aus der Literatur andeuten könnten. Sie würden dann ebensogut zum Begriff der Nährstoffwirkung gehören wie die „normalen Nährstoffe". Anders ausgedrückt würde man sagen können, daß die „Nahrung" der Pflanzen in ihrer chemischen Zusammensetzung und sonstigen Struktur vielseitiger ist, als das bei alleiniger Anwendung des Nährstoffbegriffes erscheinen könnte.

Gänzlich vermieden werden muß auch der Begriff „Reizstoff". Sofern dieser lediglich, wie es leider vielfach üblich ist, ebenso wie der Begriff „Stimulation" nur eine Umschreibung für eine Wirkung unbekannter Art bezeichnen soll, ist er einfach unwissenschaftlich. Hält man sich aber an die von *Pfeffer* gegebene Definition des Reizes als eines Auslösungsvorganges, so ergeben sich da, wo es sich um Steigerungen des Gesamtertrages handelt, Schwierigkeiten, die zu einer Ablehnung des Begriffes führen müssen, wie in der erwähnten Arbeit von *A. Rippel* und *Lohrmann* ausgeführt wurde. Es genügt hier vollkommen, den Begriff der ökologischen Nährstoffwirkung in dem oben ausgeführten Sinne zu verwenden. Die Art und Weise der Wirkung ist eine weitere Frage (ob organisch eingebauter Bestandteil, katalytische, antagonistische oder sonstige Wirkung), die jedenfalls nicht durch den Begriff der Reizwirkung gelöst werden kann.

Zusammenfassung.

Bei einer Reihe von Pilzen wurde die antagonistische Wirkung hoher Gaben von Magnesiumsulfat einerseits und von Sublimat und Borsäure andererseits untersucht. Die große Verschiedenheit der einzelnen Pilze in der Resistenz gegen diese Stoffe und in der antagonistischen Wirkung ergibt sich aus Tabelle XVII, S. 355.

Danach kann eine völlige Entwicklungshemmung durch Sublimat oder Borsäure durch ertragsschädigende hohe Gaben von Magnesiumsulfat weitgehend behoben werden, und auch diese Schädigung durch hohe Magnesiumsulfatgaben kann durch Sublimat oder Borsäure weitgehend ausgeglichen werden. Diese Wirkung ist rein antagonistisch.

Die Schädigungen durch Sublimat und Borsäure summieren sich bei gleichzeitiger Darbietung im allgemeinen; doch konnte auch eine leichte antagonistische Förderung festgestellt werden.

Sublimat und Borsäure riefen auch in einer „normalen“ Nährlösung vielfach Ertragssteigerungen hervor. Es handelt sich aber offenbar nicht um lebensnotwendige Wirkungen im allgemeinen Sinne, wie insbesondere für das Bor bei *Mucor pusillus* einwandfrei nachgewiesen werden konnte, bei gleichzeitig quantitativer Bestimmung des Bors.

Bei *Aspergillus niger* ergab sich eine deutliche Wirkung von Sublimat auf die Sporenbildung bei Verminderung des Ertrages, deren Natur noch unbekannt ist.

Der Begriff „Nährstoff“ wird durch den Begriff „Nährstoffwirkung“ ersetzt und diese durch die ökologische Betrachtung der Nährstoffwirkung erweitert.

Der Begriff „Reizstoff“ bzw. „Reizwirkung“ wird für alle zur Steigerung des Gesamtertrages führenden Vorgänge abgelehnt.

Literatur.

Arndt, R., Biologische Studien. I. Das biologische Grundgesetz. Greifswald 1892.

Biernacki, E., Pflügers Arch. **49**, 112, 1891. — *Blair, E. M. Mc V.*, Journ. Hyg. **36**, 446, 1936. — *Boas, F.*, Das phyletische Anionenphänomen. Leipzig, G. Fischer, 1927. — *Boeseken, J.*, und *H. J. Waterman*, Folia Microbiologica **1**, 342, 1912. — *Bortels, H.*, Biochem. Zeitschr. **182**, 301, 1927. — *Butkewitsch, Wl.*, u. *Fr. W. G. Orlow*, ebenda **182**, 556, 1922.

Clark, J. F., (1) Botan. Gaz. **28**, 289, 1899; **33**, 26, 1902; Journ. physic. Chem. **5**, 289, 1901. — *Derselbe* (2), ebenda **5**, 113, 1901. — *Cusumano, A.*, Staz. sper. Agr. ital. **58**, 440, 1925. — *Czapek, F.*, Biochemie der Pflanzen, 2. Aufl., Jena, G. Fischer, Bd. I, 1913.

Davis, A. R. R. H. M., *R. H. Marloth* u. *C. I. Bishop*, Phytopathol. **18**, 949, 1928. — *Duclaux, E.*, Traité de Microbiologie. Paris, Masson u. Cie, 1901, Bd. 4, S. 366 f.

Feigl, F., u. *P. Krumholz*, Mikrochemie. Pregl-Festschrift, S. 77, 1929.

Heubner, W., Biochem. Zeitschr. **145**, 431, 1924. — *Hüne*, Centralbl. f. Bakt. I, **48**, 135, 1908.

Joachimoglu, G., Biochem. Zeitschr. **130**, 239, 1922.

Kattermann, G., Botan. Arch. **28**, 73, 1930. — *Kisch, B.*, Biochem. Zeitschr. **237**, 226, 1931. — *Kitawin, G. S.*, Biochemie (Russ.) Nr. **4**, 238, 1939.

Lohmann, G., diese Zeitschr. **5**, 31, 1934. — *Löhnis, M. P.*, Meded. v. d. Landbouwhoogsch. Waageningen **41**, 3, 1937. — *Luchetti, G.*, Soc. Intern. Microbiol. Sez. Ital. **9**, 162, 1937; Ann. Fac. Agrar. R. Univ. Pisa (N. S.) **1**, 177, 196, 1938.

Martin, J. D. Jr., u. *C. D. Fowler*, Ann. Surg. **99**, 993, 1934. — *Meier, R.*, Biochem. Zeitschr. **174**, 384, 1926.

Niculescu, M., Bull. Soc. Chim. Biol. Paris **18**, 1831, 1936. — *Niethammer, A.*, diese Zeitschr. **11**, 73, 1940.

Paul, Th., u. *B. Krönig*, Zeitschr. physikal. Chem. **21**, 414, 1896; Zeitschr. Hyg. und Inf. **25**, 1, 1897. — *Pfeffer, W.*, Pflanzenphysiologie. Leipzig, W. Engelmann, Bd. I, 1897; Bd. II, 1904. — *Pirschle, K.*, Planta **23**, 264, 1935; **24**, 649, 1935. — *Pulst, C.*, Jahrb. wiss. Botan. **37**, 205, 1902.

Rehm, S., Jahrb. wiss. Botan. **85**, 788, 1937. — *Richet, Ch.*, C. r. Acad. Sc. Paris **114**, 1494, 1892. — *Rippel, A.* (1), diese Zeitschr. **7**, 210, 1936. — *Derselbe* (2), ebenda **11**, 1, 1940. — *Derselbe* (3), Das Ertragsgesetz. In *Honcamps* Handbuch der Pflanzenernährung. Bd. I. Berlin, Jul. Springer, 1931, S. 602. — *Rippel, A.*, u. *J. Keseling*, diese Zeitschr. **1**, 60, 1930. — *Rippel, A.*, u. *W. Lohrmann*, Nachr. Ges. d. Wiss. Göttingen, Math.-phys. Kl., Neue Folge. Biologie **3**, 239, 1940. — *Rippel, A.*, u. *U. Stoess*, diese Zeitschr. **3**, 492, 1932. — *Rippel, K.*, diese Zeitschr. **3**, 543, 1932. — *Rubentschik, L.*, Microbiology (Russ.) **5**, 451, 1936.

Schmucker, Th., Planta **23**, 264, 1935. — *Schnegg, H.*, u. *K. Weigand*, Centralbl. f. Bakt. II, **95**, 154, 1936. — *Schulz, H.*, Virch. Arch. f. pathol. Anatom. u. Physiol. **108**, 423, 1887; Pflügers Arch. **42**, 517, 1888. — *Seth, T. N.*, u. *S. K. Ghosh Dastidar*, Ind. J. Med. Res. **18**, 1211, 1931. — *Stapp, C.*, u. *H. Bortels*, Centralbl. f. Bakt. II, **93**, 45, 1935.

Verona, O., Soc. Intern. Microbiol. Sez. Ital. **9**, 65, 1937.

Waterman, H. J. (1), Koninkl. Akad. Wetensch. Amsterdam **21**, 1347, 1913. — *Derselbe* (2), Folia Microbiologica **1**, 422, 1912.

Zeller, H., Biochem. J. **171**, 45, 1926.

Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an Torulopsis pulcherrima (Lindner) Saccardo und Candida tropicalis (Castellani) Berkhout.

Ein Beitrag zur Systematik der Gärungsmonilien.

Von

Siegfried Windisch.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 26. September 1940.)

Nachdem die Ascosporenbildung bei *Torulopsis pulcherrima* in einigen Fällen, jedoch nur unter scheinbarer Einwirkung von *Penicillium*, beobachtet worden war (*Windisch* 1938), lag es nahe zu untersuchen, ob nicht auch in reinen Kulturen Sporenbildung auftritt und ob der Entwicklungsgang dieses Pilzes aufgeklärt werden kann. Außer *Torulopsis pulcherrima* wurden noch mehrere „Gärungsmonilien" untersucht, die sich als nahe verwandt mit dem genannten Pilz herausstellten. Von mehreren Arten konnte die bisher übliche Bezeichnung nicht ermittelt werden, ich beschränke mich daher auf *Candida tropicalis*.

Im folgenden sollen die Beobachtungen an diesen Pilzen zunächst getrennt beschrieben und die Ergebnisse systematischer Art im Zusammenhang und unter Heranziehung vorhandenen Schrifttums bearbeitet werden. Ehe ich meine Beobachtungen mitteile, sei noch bemerkt, was über die behandelten Pilze und ihren Verwandtschaftskreis bekannt ist.

Von *Torulopsis pulcherrima* liegt eine genaue Beschreibung vor von *J. Lodder*, die diesen Pilz 1934 bearbeitet hat. Die morphologischen Eigenschaften sind noch nicht näher untersucht worden, sonst hätte man finden müssen, daß auch *Torulopsis pulcherrima* Pseudomycel bildet und demgemäß nicht zu *Torulopsis* und nicht zu den *Torulopsidoideae*, sondern zu *Candida* und den *Mycotoruloideae* gehört.

Über die „Gärungsmonilien", die zu den *Mycotoruloideae* gehören, liegen zahlreiche Arbeiten vor. Jahrzehntelang herrschte über diese Pilze Unklarheit bezüglich ihrer Zusammengehörigkeit und ihrer systematischen Stellung, zumal man nichts von ihrer generativen Vermehrung wußte. Endlich 1938 haben es *Langeron* und *Guerra* unternommen, sowohl morphologische Eigenarten wie biochemische Fähigkeiten der ihnen zugänglich gewesenen Arten mit verbesserten und zum Teil neuen Methoden festzustellen. Ihre Bemühungen haben dazu geführt, daß 16 Arten der von *Berkhout* 1923 aufgestellten Gattung *Candida* bestimmt werden können. Die Arbeit von *Langeron* und *Guerra* stellt den ersten festen Punkt dar in dem fließenden Durcheinander von abweichenden Benennungen und mangel-

haften Methoden. Jedoch auch diese Autoren lehnen eine bisherige Kenntnis der Sporenbildung ab.

Dennoch ist die Ascosporenbildung, wenn auch nur bei einer Art, *Candida albicans*, zweimal behauptet worden: 1898 beschrieb *Vuillemin* die Ascosporenbildung zum ersten Male. Er bezeichnete die Asci als „véritables organes reproducteurs“. Die Asci sollten 4×5 μ groß sein und je vier Sporen von der Form einer abgeplatteten Ellipse und den drei Durchmessern von $2{,}8-3{,}5 \times 1{,}75-2 \times 1{,}2-1{,}4$ μ enthalten. Er beschrieb die Ausstülpung des Ascus, nennt das die Sporen umgebende, auffallende Epiplasma und bemerkt auch, daß die Asci frei werden können vor Entlassung der Sporen. Der zweite, der eine Ascosporenbildung behauptet hat, war *Okabe* 1929; der von ihm bearbeitete Pilz war wahrscheinlich ebenfalls eine *Candida albicans*. *Okabe* berichtet von Asci mit meist einer, selten zwei und ganz selten vier Sporen.

Damit erschöpft sich die bisherige Kenntnis des Entwicklungsganges candidoider Organismen. Hinzuzufügen ist noch die nicht uninteressante Kritik, die *Vuillemin* und *Okabe* erfahren haben. *Damm* lehnt die Ergebnisse *Okabes* durchaus ab, obwohl er, wie aus seinen eigenen Worten und Abbildungen hervorgeht, sicher Sporenbildung gesehen, sie aber nicht als solche erkannt hat. *Langeron* und *Guerra* fassen ihre Meinung dahingehend zusammen, die bisherigen Ergebnisse seien zu ungenau und dürftig, als daß man die *Candideae* zu den sporenbildenden, d. h. echten Hefen oder *Saccharomycetes* rechnen dürfte. Meine eigene vorläufige Mitteilung wurde wegen Fehlens einer Photographie von *Castelli* in Zweifel gezogen, den die vorliegende Abhandlung beheben dürfte (siehe Nachtrag).

Die vorliegenden Untersuchungen haben die Klärung der Frage nach der Sporenbildung und dem vollständigen Entwicklungsgang zweier *Candideae* zum Ziel zwecks Eingliederung in das natürliche System.

Torulopsis pulcherrima (Lindner) Saccardo.

Dieser Organismus ist ziemlich häufig. Mehrfach konnte ich ihn isolieren, und zwar von Preßhefe sowohl als auch von Kirschen und Johannisbeeren. *Torulopsis pulcherrima* stellt einen Typ dar, der das Verständnis der vorliegenden Pilzgruppe der *Mycotoruloideae* in jeder Hinsicht und so auch in morphologischer erleichtert. Nur wegen des angeblichen Fehlens von Pseudomycel ist *Torulopsis pulcherrima* von *Lodder* 1934 zu den *Torulopsidoideae* gerechnet worden. *Torulopsis pulcherrima* ist an sich ebenso vielförmig wie die *Candida*-Arten, entwickelt aber ihre Formen einerseits sehr extrem und dadurch deutlich, andererseits nicht alle zugleich, sondern abgesetzt nacheinander. Vor allem hat sie aber Entwicklungsabschnitte, die lange erhalten bleiben können und nicht immer so wie bei den *Candida*-Arten rasch ineinander übergehen.

Diese Verhältnisse sind beobachtet worden von *B. Porchet*, die auf Grund ihrer Versuche von einem „phénomène de dissociation“ spricht: Der Pilz bestehe aus 2 Typen, von denen der zweite allerdings durch Überimpfen auf Bierwürze oder Glucose-Hefewasser wieder in den ersten übergeht.

Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an Torulopsis pulcherrima (Lindner) Saccardo und Candida tropicalis (Castellani) Berkhout.

Ein Beitrag zur Systematik der Gärungsmonilien.

Von

Siegfried Windisch.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 26. September 1940.)

Nachdem die Ascosporenbildung bei *Torulopsis pulcherrima* in einigen Fällen, jedoch nur unter scheinbarer Einwirkung von *Penicillium*, beobachtet worden war (*Windisch* 1938), lag es nahe zu untersuchen, ob nicht auch in reinen Kulturen Sporenbildung auftritt und ob der Entwicklungsgang dieses Pilzes aufgeklärt werden kann. Außer *Torulopsis pulcherrima* wurden noch mehrere „Gärungsmonilien" untersucht, die sich als nahe verwandt mit dem genannten Pilz herausstellten. Von mehreren Arten konnte die bisher übliche Bezeichnung nicht ermittelt werden, ich beschränke mich daher auf *Candida tropicalis*.

Im folgenden sollen die Beobachtungen an diesen Pilzen zunächst getrennt beschrieben und die Ergebnisse systematischer Art im Zusammenhang und unter Heranziehung vorhandenen Schrifttums bearbeitet werden. Ehe ich meine Beobachtungen mitteile, sei noch bemerkt, was über die behandelten Pilze und ihren Verwandtschaftskreis bekannt ist.

Von *Torulopsis pulcherrima* liegt eine genaue Beschreibung vor von *J. Lodder*, die diesen Pilz 1934 bearbeitet hat. Die morphologischen Eigenschaften sind noch nicht näher untersucht worden, sonst hätte man finden müssen, daß auch *Torulopsis pulcherrima* Pseudomycel bildet und demgemäß nicht zu *Torulopsis* und nicht zu den *Torulopsidoideae*, sondern zu *Candida* und den *Mycotoruloideae* gehört.

Über die „Gärungsmonilien", die zu den *Mycotoruloideae* gehören, liegen zahlreiche Arbeiten vor. Jahrzehntelang herrschte über diese Pilze Unklarheit bezüglich ihrer Zusammengehörigkeit und ihrer systematischen Stellung, zumal man nichts von ihrer generativen Vermehrung wußte. Endlich 1938 haben es *Langeron* und *Guerra* unternommen, sowohl morphologische Eigenarten wie biochemische Fähigkeiten der ihnen zugänglich gewesenen Arten mit verbesserten und zum Teil neuen Methoden festzustellen. Ihre Bemühungen haben dazu geführt, daß 16 Arten der von *Berkhout* 1923 aufgestellten Gattung *Candida* bestimmt werden können. Die Arbeit von *Langeron* und *Guerra* stellt den ersten festen Punkt dar in dem fließenden Durcheinander von abweichenden Benennungen und mangel-

haften Methoden. Jedoch auch diese Autoren lehnen eine bisherige Kenntnis der Sporenbildung ab.

Dennoch ist die Ascosporenbildung, wenn auch nur bei einer Art, *Candida albicans*, zweimal behauptet worden: 1898 beschrieb *Vuillemin* die Ascosporenbildung zum ersten Male. Er bezeichnete die Asci als „véritables organes reproducteurs". Die Asci sollten 4 × 5 μ groß sein und je vier Sporen von der Form einer abgeplatteten Ellipse und den drei Durchmessern von 2,8—3,5 × 1,75—2 × 1,2—1,4 μ enthalten. Er beschrieb die Ausstülpung des Ascus, nennt das die Sporen umgebende, auffallende Epiplasma und bemerkt auch, daß die Asci frei werden können vor Entlassung der Sporen. Der zweite, der eine Ascosporenbildung behauptet hat, war *Okabe* 1929; der von ihm bearbeitete Pilz war wahrscheinlich ebenfalls eine *Candida albicans*. *Okabe* berichtet von Asci mit meist einer, selten zwei und ganz selten vier Sporen.

Damit erschöpft sich die bisherige Kenntnis des Entwicklungsganges candidoider Organismen. Hinzuzufügen ist noch die nicht uninteressante Kritik, die *Vuillemin* und *Okabe* erfahren haben. *Damm* lehnt die Ergebnisse *Okabes* durchaus ab, obwohl er, wie aus seinen eigenen Worten und Abbildungen hervorgeht, sicher Sporenbildung gesehen, sie aber nicht als solche erkannt hat. *Langeron* und *Guerra* fassen ihre Meinung dahingehend zusammen, die bisherigen Ergebnisse seien zu ungenau und dürftig, als daß man die *Candideae* zu den sporenbildenden, d. h. echten Hefen oder *Saccharomycetes* rechnen dürfte. Meine eigene vorläufige Mitteilung wurde wegen Fehlens einer Photographie von *Castelli* in Zweifel gezogen, den die vorliegende Abhandlung beheben dürfte (siehe Nachtrag).

Die vorliegenden Untersuchungen haben die Klärung der Frage nach der Sporenbildung und dem vollständigen Entwicklungsgang zweier *Candideae* zum Ziel zwecks Eingliederung in das natürliche System.

Torulopsis pulcherrima (Lindner) Saccardo.

Dieser Organismus ist ziemlich häufig. Mehrfach konnte ich ihn isolieren, und zwar von Preßhefe sowohl als auch von Kirschen und Johannisbeeren. *Torulopsis pulcherrima* stellt einen Typ dar, der das Verständnis der vorliegenden Pilzgruppe der *Mycotoruloideae* in jeder Hinsicht und so auch in morphologischer erleichtert. Nur wegen des angeblichen Fehlens von Pseudomycel ist *Torulopsis pulcherrima* von *Lodder* 1934 zu den *Torulopsidoideae* gerechnet worden. *Torulopsis pulcherrima* ist an sich ebenso vielförmig wie die *Candida*-Arten, entwickelt aber ihre Formen einerseits sehr extrem und dadurch deutlich, andererseits nicht alle zugleich, sondern abgesetzt nacheinander. Vor allem hat sie aber Entwicklungsabschnitte, die lange erhalten bleiben können und nicht immer so wie bei den *Candida*-Arten rasch ineinander übergehen.

Diese Verhältnisse sind beobachtet worden von *B. Porchet*, die auf Grund ihrer Versuche von einem „phénomène de dissociation" spricht: Der Pilz bestehe aus 2 Typen, von denen der zweite allerdings durch Überimpfen auf Bierwürze oder Glucose-Hefewasser wieder in den ersten übergeht.

Die Beschreibung der 2 Typen ist wichtig genug, um hier wiedergegeben zu werden:

Typ 1. Gelatine wird verflüssigt. Kolonien *rosa oder rot*, längliche Zellen, in denen man manchmal eine Vakuole und immer ein oder zwei lichtbrechende Körperchen unterscheidet. Pseudomycelbildung. Alkoholbildung besser als bei 2.

Typ 2. Keine Gelatineverflüssigung. Kolonien weiß, glatt, ohne pseudomyceliale Ausläufer. Zellen rund, mit großen Öltröpfchen. Keine Pseudomycelbildung. Alkoholbildung schwächer als bei 1.

Porchet hat ebenso wie *Grosbüsch* die Bildung des roten Farbstoffes besonders interessiert. In meinen zahlreichen Versuchen während der letzten 2 Jahre ist die Farbstoffbildung nur zweimal schwach aufgetreten. Meine *Torulopsis pulcherrima*-Stämme wären demnach dem Typ 2 zuzuordnen. Im allgemeinen trifft auch *Porchets* Beschreibung 2 für meine Stämme zu. Im Gegensatz dazu steht aber, daß, wie schon 1938 kurz erwähnt wurde, Pseudomycel reichlich gebildet werden kann. Außerdem hat *Torulopsis pulcherrima* in Bierwürze stets massenhaft Pseudomycel, aber keinen Farbstoff gebildet. Dennoch habe auch ich zwei „Formen" feststellen können, die sich morphologisch und physiologisch unterschieden. Wie sich herausgestellt hat, sind die zwei Formen einfach aufeinanderfolgende getrennte Entwicklungsstadien.

Die eine Form (ähnlich *Porchets* Typ 1) bildet schwache konzentrische Ringe in Agarkultur und am Rande reichlich Pseudomycel, aber nur im Agar, nicht oberflächlich. Die Kolonie wächst halbkugelig in den Agar hinein. Die Zellen sind gleichmäßig länglich-oval und stimmen in ihren Maßen ziemlich überein mit den Angaben bei *Lodder* (S. 131). Die andere Form (nach *Porchet* Typ 2) hat vorwiegend rundliche, höchstens kurzovale Zellen. Die Kolonie wächst langsam gleichmäßig und ohne Ringe. Nach 1 bis 2 Monaten werden allmählich kleine kugelige Erhebungen gebildet, deren Durchmesser nur Bruchteile eines Millimeters betragen und die der Kultur ein gekörntes Aussehen geben. Beide Formen bilden in ihren Zellen Öltropfen aus. In Kulturen der zweiten Form treten mit zunehmendem Alter große kugelrunde Zellen auf mit sehr großen Öltropfen, die sehr hübsch aussehen und dem Pilz seinen Namen verschafft haben. An diesen Zellen von 9—20 μ Durchmesser hängen oft regelmäßig eingerollte oder gefaltete Hautreste. Je mehr solche Zellen da sind, desto mehr winzige Zellchen treten auf, die nur etwa 2—3 × 4—6 μ messen.

In Bierwürze bei 30° tritt sogleich starke Gärung ein. Nach 9 Tagen haben sich eine hauchdünne Decke, ein Hefering und ein feiner fester Bodensatz gebildet. Die Flüssigkeit bleibt klar. In Würze wird viel Pseudomycel gebildet. Die Sproßzellen messen 4,9—9,4 × 6,1—11 μ, die pseudomycelialen Zellen 2,5—5,7 × 13,5—26 μ. Die Größenschwankungen sind hier auch wie bei den verwandten Pilzen außerordentlich. Echtes Mycel wurde nicht festgestellt.

Alle nunmehr zu beschreibenden Vorgänge sind in der Zeichnung der Abb. 5 (S. 376) samt nochmals erläuterndem Text zusammengestellt. Abb. 1 bis 4 geben einige Mikroaufnahmen als Originalbelege.

Hat man *Torulopsis pulcherrima* punktförmig auf ein Schrägagarröhrchen mit *Sabourauds* Nährboden (Agar mit 1 % Pepton und 3 % Maltose) geimpft, so wird nach wenigen Tagen schon eine Neigung sichtbar, Öltröpfchen zu bilden, mehrere kleine oder, wie meist, eins, das allmählich immer größer wird. Sonstige Zellinhaltsstoffe sind nicht sichtbar. Schon nach einigen Tagen kann man Zellen sehen, in denen sich der ursprünglich runde Öltropfen verlängert. Von der Mitte her dringt er an einer Seite zur Zellwand hin. Die Wand beult sich aus, schließlich teilt sich der Öltropfen. Auch die Ausstülpung teilt sich als Zelle ab, so daß sich die eine Hälfte des Öltropfens in der Mutter-, die andere in der Tochterzelle befindet. Unter dem Schutz der optischen Eigenschaften des Öls ist nichts von einer Sporenbildung zu sehen, bis nach kurzer Zeit die Tochterzelle an der Ansatzstelle an der Mutterzelle aufplatzt. Fast immer treten alle oder wenigstens ein bis drei Sporen sofort aus, zu gleicher Zeit auch etwas Protoplasma, was in flüssigen Kulturen gut zu beobachten ist.

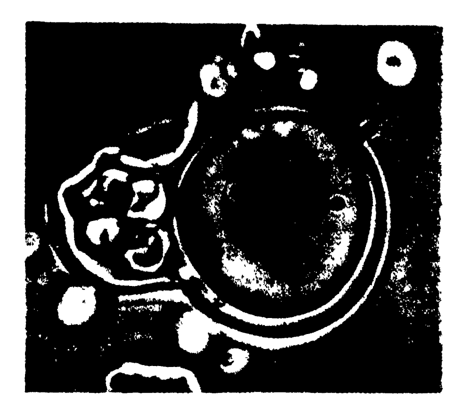


Abb. 1. *Candida (Torulopsis) pulcherrima.* Eingerissener Ascus mit allen 4 Sporen. 2300 ×. Leitz-Fluorit-Ölimmersion, n. Ap. 1,32, Eigenvergrößerung 114 ×.

Die nach der Teilung des öligen Inhaltskörpers entstandene Tochterzelle ist somit als ausgestülpter Ascus anzusehen. Daß, wie im Lichtbild der Abb. 1, der eingerissene Ascus noch alle vier Sporen enthält, ist ein seltener Fall. Als ich den Ascus im Präparat fand, war er noch ganz. Auf gelinden Druck auf das Deckglas sprang er vor meinen Augen auf. In diesem Zustande habe ich ihn bei 2300facher Vergrößerung aufgenommen. Daß die reifen intakten Asci, außer in den Spezialpräparaten, die ich gleich beschreiben werde, selten zu sehen sind, liegt an der hohen Empfindlichkeit der Ascusmembran gegen physikalische Veränderungen der Umgebung, ferner daran, daß der Ascus sich schnell entwickelt und in reifem Zustand nur kurz erhalten bleibt (ein grundlegender Unterschied gegenüber den *Saccharomycetes!*), und schließlich vor allem daran, daß das die Sporen umgebende Epiplasma leicht verquillt und dabei den Ascus zum Platzen bringt, so regelmäßig in

Wasserpräparaten von Material aus Agarkulturen. Versuche in Glycerin, Paraffin oder dergleichen zu präparieren schlugen fehl.

Nach dem Einreißen sitzt der Ascus wie eine Kappe auf der Mutterzelle auf, bis alle vier Sporen ihn verlassen haben. Wenn er leer ist, rollt er sich meist in schön geschwungenen Formen ein oder er bleibt, bischofsmützenartig eingefaltet, auf der Mutterzelle sitzen. Abb. 3 und 4

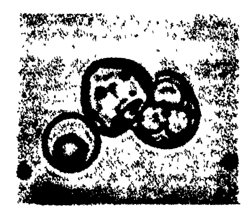


Abb. 2.

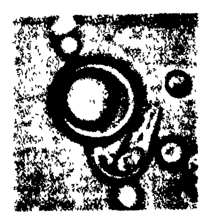


Abb. 3.

Abb. 2. *Candida (Torulopsis) pulcherrima.* Mutterzelle mit eingerissenem Ascus, in dem sich noch 3 Sporen befinden, etwa 900 ×.

Abb. 3. *Candida (Torulopsis) pulcherrima.* Mutterzelle mit großem Öltropfen und soeben geplatztem Ascus: 1 Spore hängt noch in der Ascushaut, die 3 anderen Sporen liegen frei in der Nähe, etwa 900 ×.



Abb. 4. *Candida (Torulopsis) pulcherrima.* Mutterzellen nach der Sporenbildung: 2 eingefaltete leere Asci (Pfeile!), zahlreiche Sporen und deren Nachkommen: die „kleinzellige Generation", 700 ×.

zeigen diese Verhältnisse an Mikroaufnahmen. Nach einiger Zeit fällt er dann ab und ist als lose, leere Haut noch manchmal anzutreffen. Die Mutterzelle sproßt wieder aus; noch während der erste Ascus aufsitzt, kann sie durch Sprossung eine oder mehrere Tochterzellen hervorbringen, von denen sich nicht sicher entscheiden läßt, ob sie nun auch

Asci werden oder Sproßzellen bleiben sollen. Häufig fallen sie ab. Sogar dies spricht aber nicht gegen die Möglichkeit, daß sie sich doch noch zu Ascis entwickeln. Ich habe in älteren Kulturen solche rundliche Zellen gesehen, die in sich sichtbare Sporentetraden trugen. Ihre Zellwand war dabei auffallend stark, so daß sie geradezu Dauersporen- oder besser Dauersporangiencharakter tragen.

Die ölige, stark lichtbrechende und schwach grün schimmernde Substanz in den Zellen der *Torulopsis pulcherrima* spielt vielleicht eine Rolle bei der Ascosporenbildung. Die Sporen in den freien Ascis scheinen geradezu aus dem Öl umgebildet zu sein. Außerdem ist auffallend, daß und wie regelmäßig sich der Öltropfen beim Ausstülpen eines Ascus teilt, so daß er zum *morphologischen Leitmerkmal* wird. Daß Ölmassen bei der Sporenbildung eine Rolle spielen, hebt u. a. hervor *G. Baltatu*, der bei zahlreichen *Mycoderma*-Arten 1939 die Sporenbildung entdeckt hat. *Baltatu* ist der Ansicht, daß es sich nicht um reine Fette, sondern um „fettreiches Sporoplasma" handelt. Die regelmäßige Fetttropfenteilung läßt vermuten, daß mit dem Tropfen u. a. der Kern oder die Kerne der Zelle irgendwie zusammenhängen. Bei den Hefen tritt im „oxydativen Stadium" (*Schanderl* 1936) ebenfalls leicht Fettbildung ein, im Anschluß daran die Sporenbildung. Auch sonst ist bei *Ascomyceten* die Bildung von Fett vor oder während der Sporenentwicklung verbreitet.

Ob das Fett der *Torulopsis pulcherrima* für die Sporenbildung eine maßgebliche Rolle spielt oder ob letztere aus anderen Ursachen auf die Fettbildung folgt, ist eine noch offene Frage. Die Sporen hängen nach dem Verlassen des Ascus meist nicht aneinander, bleiben aber öfter noch außen an der Mutterzelle kleben. In Kulturen, die viele leere Asci und dementsprechend viele Sporen enthalten, sieht man dann lange Zeit unverändert die gleichmäßig großen Ascosporen, die sich deutlich von den großen fetthaltigen Mutterzellen und ebenso deutlich von den vegetativen Zellen unterscheiden. Alle Sporen enthalten kleine Öltropfen. Die Feststellung von *Lindner*, daß nach einer „Häutung" von großen „*pulcherrima*"-Zellen eine „kleinzellige Generation" entsteht, ist somit gewissermaßen richtig, nur handelt es sich dabei eben um einen generativen Vorgang.

Kultiviert man *Torulopsis pulcherrima* in irgendeiner geeigneten zuckerhaltigen Lösung im Hohlschliffobjektträger, und zwar so, daß der ganze Hohlschliff wie bei der *Lindner*schen Kleingärmethode außer einer kleinen Luftblase von 2 bis 3 mm Durchmesser mit Flüssigkeit gefüllt, mit Deckglas belegt und mit Vaseline verschlossen ist, so kann man folgendes beobachten: Die intakten Asci platzen vorzugsweise nicht an der Mutterzelle, sondern werden frei. Die vier Sporen sind merkwürdig undeutlich. Das Plasma sieht verklumpt aus. Die

Asci öffnen sich sodann an der Längsseite und entlassen die Sporen zusammen mit Plasmaschlieren, die um die Sporen herumhängen. Nach einigen Tagen werden die Sporen von diesem Epiplasma frei (natürlich nur in diesem Spezialpräparat!), das auch weiterhin als formlose Masse in der Flüssigkeit herumschwimmend beobachtet werden kann. Ebenso charakteristisch wie dies Epiplasma sind die seitwärts geöffneten leeren Häute von Zellen, die als Asci fungiert haben. In den gleichen Kulturen findet man einige unreife Asci, bei denen sich allmählich Sporenanlagen aus dem Öltropfen differenzieren: Dabei wird deutlich, daß zunächst zwei runde Plasmaklumpen entstehen. Diese bekommen dann Semmelform, bis sich zweimal zwei Sporenanlagen bilden. Erst nach und nach werden aus den beiden Paaren eng zusammenhängender Plasmamassen vier nahezu kugelige Körper, die zur Sporengestalt heranwachsen.

Beschickt man *Winge-Ranvier*sche Kammern (nach *Winge* 1937) mit einer Suspension von *Torulopsis pulcherrima* in 10 %iger Biomalzlösung und verschließt sie mit Vaseline oder Paraffin, so entwickelt sich der Pilz wie folgt: alle Zellen sprossen aus und bilden nach 1 bis 2 Tagen kleine Sproßverbände. Bei den Kolonien, die nahe dem Luftring liegen, tritt üppigeres Wachstum ein, das nach spätestens 3 Tagen aufhört. Die Ausbildung stark ölhaltiger „*pulcherrima*"-Zellen geht rasch vor sich. Die Zellverbände fallen auseinander. Es werden Asci gebildet, die nicht abfallen und im Laufe von 1 Tag bereits reif sind, platzen und vier Sporen entlassen, die sehr gleichmäßig 2×3 μ groß sind. Die Sporen beginnen sofort zu sprossen. Vom 4. Tage ab sind daher die Kolonien umgeben von einem zunehmenden Kranze kleiner Tochterzellen, die aus Ascosporen gesproßt sind. Manchmal liegen sie in kleinen Verbänden oder Ketten von zwei bis zu zehn Zellen, manchmal auch einzeln. Die „kleinzellige Generation" ist hier deutlich abgegrenzt von den Mutterzellen. Es ist noch hervorzuheben, daß es stets vier Sporen sind, die sich im Ascus entwickeln. Da die Sporen aber nicht immer alle auf einmal entlassen werden, findet man oft Asci mit einer oder zwei einhängenden Sporen. Diese sind jedoch ausnahmslos eingerissen! Die Angabe von *Okabe*, in den Ascis seien eine oder zwei Sporen gebildet worden, rührt daher, daß er nicht bemerkt hat, daß derartige Asci nicht mehr intakt sind.

Dieser Versuch mit der *Winge-Ranvier*schen Kammer ist der instruktivste und zeigt die Stadien gut abgesetzt in situ, was natürlich im einfachen Klatschpräparat nur selten in solcher Vollkommenheit erreicht wird. Außerdem lassen sich hier, wo sich der Pilz besonders gleichmäßig und charakteristisch entwickelt, Größenmessungen anstellen, die folgende durchschnittlichen Ausmaße ergaben: bei den meist einzelnen Sproßzellen $6{,}1 \times 7{,}2$ μ, bei den „*pulcherrima*"-Zellen 9×10 μ.

Riesige alte Mutterzellen haben in Agarkulturen zuweilen bis zu 20 μ Durchmesser.

Vorhin erwähnte ich bereits, daß ältere Agarkulturen von *Torulopsis pulcherrima* kleine punktförmige Wärzchen tragen. Eine nähere Untersuchung solcher Erhebungen zeigte, daß es sich dort um Haufen von alten Mutterzellen und von Ascosporen bzw. Zellen handelt, die Ascosporen sehr ähnlich sehen. Das veranlaßte mich, von solchen punktförmigen Erhebungen auf Würze- oder Biomalzagar abzuimpfen. Aus der Impfmasse entwickelte sich langsam eine Kolonie, die nur aus den kleinen Zellen bestand, die sich durch Sprossung weiter vermehrten. Schließlich treten in der Mitte der Kultur wieder die bekannten Sproßzellen üblicher Größe auf, die dann sehr rasch Mutterzellen bilden. So liegt hier ein abgekürzter Entwicklungsgang vor, bei dem die vegetativen Formen unterdrückt werden und die generativen vorherrschen. In Agarkulturen von 3 bis 6 Tagen ist selten, wenn aber, dann deutlich zu sehen, daß ungleich große, rundliche, durch Sprossung von Ascosporen erzeugte Nachkommenzellen sich aneinanderlegen. Die Wandstücke zwischen ihnen lösen sich auf, so daß die beiden Zellen dann mit mehr oder weniger breiter Basis aufeinandersitzen. Der kleinere Partner ergießt seinen ganzen Inhalt in den größeren. Dieser erzeugt dann durch Sprossung an beliebiger Stelle, vorzüglich im rechten Winkel zum Kopulanten, eine Tochterzelle. Diese Blastospore — so heißen derartige thalluseigene Sproßzellen — wird bald frei und die leeren Häute der verschmolzenen Partner, die somit Haplonten gewesen sein müssen, schwimmen im Präparat herum.

Es ergibt sich also, daß die Ascosporen sprossen und zahlreiche gleichgestaltete kleine Zellen erzeugen. Die Nachkommenzellen gehen dann durch Kopulation in die bekannten vegetativen Formen normaler Größe über, zu denen auch Pseudomycel zählt. Aus freien Sproßzellen oder Blastosporen gehen die starkwandigen Mutterzellen hervor, die einen oder auch mehrere Asci nacheinander bilden können. Den Ascis entsprechende Tochterzellen können auch frei werden und erst dann — nur scheinbar nach Art der *Saccharomycetes* — vier Sporen bilden. Daraus geht hervor, daß die Frage nach den Kernverhältnissen hier wirklich eine „Kernfrage“ ist. Da einerseits die Ascosporen natürlicherweise haploid sein müssen, der Ascus aber diploid, bleibt die Frage nach der Karyogamie zunächst noch offen. Auf die Kernverhältnisse werde ich bei *Candida tropicalis* näher eingehen. Die Ascusmutterzellen (= „*pulcherrima*“-Zellen) tragen den Charakter von Chlamydosporen oder Gemmen. In beiden Fällen, ob die Asci frei werden oder nicht, bildet schließlich die Mutterzelle aus dem Rest ihrer Masse und Energie selbst noch vier Sporen, mit deren Entlassung ihr Leben erlischt.

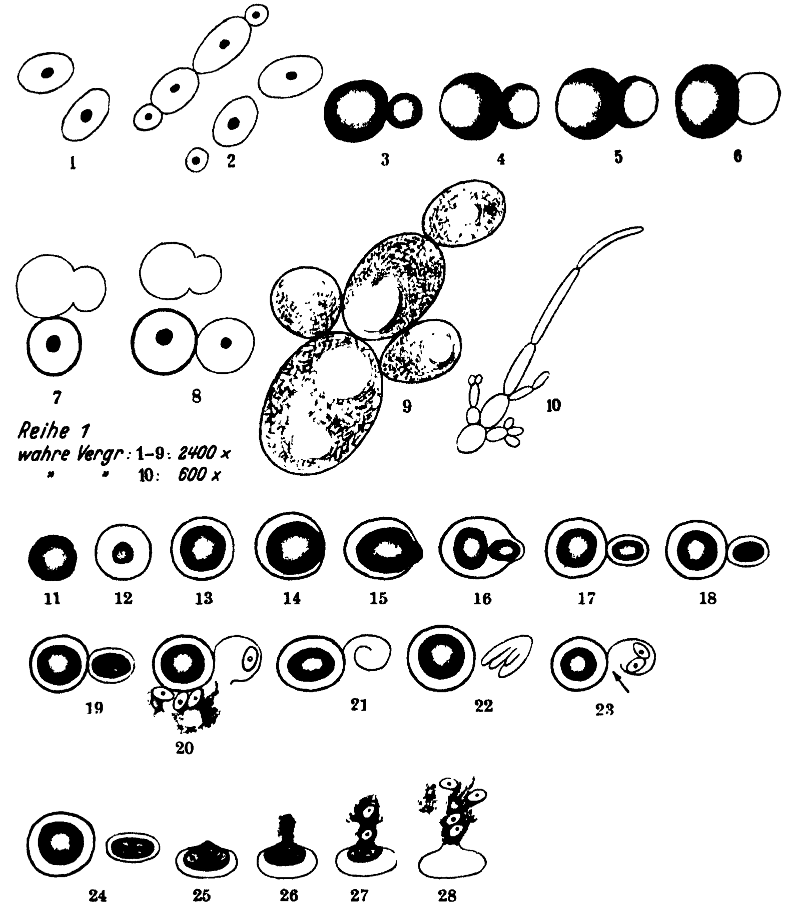


Abb. 5. *Entwicklungsgang von Candida (Torulopsis) pulcherrima.*

1. Reihe: Ascosporen — Kopulation — vegetative Phase. 1. Freie Ascosporen. 2. Sprossung der Nachkommenzellen und Zerfall der Sproßverbände. 3. Beginn der Kopulation. 4. Langsame Lösung der sich berührenden Zellwände. 5. Plasmogamie. 6. Der kleinere Partner hat sich in den größeren entleert. 7. Der größere Kopulant sproßt die erste Blastospore, die seinen ganzen Zellinhalt bekommt. 8. Die leeren Häute der Kopulanten bleiben zurück, die Blastospore sproßt weiter. 9. Schematisches Bild der unregelmäßigen Sprossung. 10. Sprossung und Übergang zu Pseudomycel.

II. Reihe: Chlamydospore — Ascusmutterzelle — Ascus. Unter geeigneten oxydativen Bedingungen wird in der Blastospore 11. ein Öltropfen gebildet. 12. u. 13. Dieser nimmt an Größe zu, bis er fast die ganze Zelle ausfüllt. Die Zellwand wird dicker. Die Chlamydospore = Ascusmutterzelle ist fertig. 14. Der Öltropfen beginnt an einer Stelle an die Wand zu dringen. 15. Die Wand beult sich aus. 16. Der Öltropfen hat sich geteilt. 17. Die Zelle hat sich geteilt. 18. Beginnende Querfurchung der jetzt kaum noch lichtbrechenden Masse.

III. Reihe: 19. bis 23. Erste Möglichkeit: Der Ascus wird *nicht* frei. 19. Quer- und Längsfurchung. Die Massen der 4 Sporen sind schon fertig geteilt, undeutliche Sichtbarkeit durch das umhüllende Epiplasma. 20. Ohne sichtbare Übergänge platzt plötzlich der Ascus an der Ansatzstelle an der Mutterzelle auf und entläßt nacheinander die Sporen. Begleitendes Epiplasma ist nur in flüssigen Medien sichtbar, da es auf festen Nährböden sofort austrocknet. Oft sitzen die Sporen nach dem Verlassen des Ascus noch an der Wand der Mutterzelle. 21. Der entleerte Ascus rollt oder faltet sich ein. 22. Nach einiger Zeit fällt die leere Ascushaut ab. 23. Manchmal bleiben 1 oder 2 Sporen noch einige Zeit im eingerissenen Ascus hängen (Pfeil deutet zur Rißstelle).

IV. Reihe: 24. bis 28. Zweite Möglichkeit: Der Ascus wird frei. 24. Die Ascuszelle wird frei. Ihr Entwicklungszustand zur Zeit des Freiwerdens ist verschieden, nicht immer ist ihr Inhalt schon so deutlich gefurcht. 25. Die meist rhombisch in der Fläche nebeneinander liegenden Ascosporen sind hier besser sichtbar als im ersten Falle und drängen zu einer Längswand. 26. Die Längswand öffnet sich, Plasmaschlieren treten aus. 27. Die Sporen kommen einzeln nacheinander mit noch weiterem Epiplasma heraus. 28. Die Ascosporen sind frei, oft bleiben einige oder alle noch durch das Epiplasma verbunden. Die leere Ascushülle mit der charakteristischen längsseitlichen Öffnung ist oft anzutreffen.

Candida tropicalis.

Eine von mir aus Preßhefe isolierte *Candida tropicalis* (*Castellani*) *Berkhout* wies in älterer Agarkultur ebensolche Hautfetzen auf, wie sie die Ascusreste bei *Torulopsis pulcherrima* darstellen. Das veranlaßte mich, den Pilz näher zu untersuchen. *Candida tropicalis* wächst auf Agar als rein weißer, etwas glänzender Belag. Die Kolonie breitet sich gleichmäßig aus in der Fläche und in der Tiefe, so daß ein Wachstum in halbkugeligem Raum zustande kommt. Auf der Agaroberfläche wächst zunächst nur die hefeartig sprossende Form. Die Zellen sind rundlich bis kurzoval und deutlich vakuolisiert. Die Sprossung erfolgt nicht an bestimmten Stellen, sondern um die ganze Zelle herum. Aus Sproßzellen gehen häufig Verbände hervor, die meist in nicht sehr festem Zusammenhang stehen. In den Agar hinein wachsen langgestreckte Zellen, die sich zu Pseudomycel verbinden. Hat die Kolonie an der Oberfläche einen Durchmesser von etwa 1 cm erreicht, so wachsen immer mehr Sproßzellen zu langen baumstammartigen Zellen aus, die noch längere und dünnere hervorbringen. Außen ist die Kolonie daher oft von Pseudomycelsträngen begrenzt. Sämtliche Zellen der Kolonie sind in der Lage, Öltropfen auszubilden, die indessen nie so groß und schön werden wie bei *Torulopsis pulcherrima*. Sie treten auch nicht so regelmäßig auf und kennzeichnen hier auch nicht irgendwelche Stadien (wie bei *Torulopsis pulcherrima* z. B. die Ascusmutterzellen). Sehr oft sind zwei solche kugelige Tropfen in der Zelle vorhanden, und zwar je einer an den beiden Polen der Zelle. Mit zunehmendem Alter der Kolonie werden die Zellformen und -größen immer stärker verschieden. Lange und runde Zellen, winzige und große liegen durcheinander.

Während nun *Torulopsis pulcherrima* in gleich alter Kultur die großen kugelrunden Zellen bildet mit einem fast die ganze Zelle ausfüllenden Öltropfen, sind bei *Candida tropicalis* die Zellen, die zur generativen Vermehrung schreiten, nicht besonders kenntlich außer durch eine etwas stärkere Zellwand und sehr oft größere Ausmaße. Auch sie sind, wiewohl nicht so kraß von vegetativen Zellen verschieden wie die „*pulcherrima*"-Zellen, ebenso wie diese als Chlamydosporen zu bezeichnen. Manche generative Zellen enthalten Öltropfen, die nicht auffallend groß sind, manche andere gar keine. Nach kurzer Zeit findet man zahlreiche Zellchen, die sehr gleichmäßig klein sind und ein Öltröpfchen enthalten. Gleichzeitig findet man Zellen verschiedener Größe, die Hautfetzen an sich tragen. Entweder schmiegt sich die Haut der Mutter-

zelle an oder sie hat sich eingerollt oder eingefaltet. Freie Häute sind nur gelegentlich zu sehen. Je älter die Kultur, desto mehr Zellen mit Häuten sind zu sehen, desto größer sind meist auch die Mutterzellen der Häute und desto größer schließlich die Masse der winzigen Zellen. Letztere gehen bald dazu über, durch Sprossung gleichgroße Zellen hervorzubringen.

In Bierwürze ruft *Candida tropicalis* bei 30° C schon nach wenigen Stunden Gärung hervor. Eine Decke wird nicht gebildet. Der Pilz entwickelt eine üppige Bodenvegetation, die wolkig aufliegt. Diese besteht hauptsächlich aus Pseudomycel, das seitlich und an der Spitze massenhaft sproßt. Die dabei erzeugten sogenannten „Sproßkonidien" — ein irreführender Ausdruck, der vermieden und besser durch den aus der französischen Schule stammenden Ausdruck Blastosporen ersetzt werden sollte — sprossen selbst weiter zu Sproßverbänden, die meist bald wieder zerfallen. Nach 9 Tagen finden sich in der Würze Zellen verschiedenster Form und Größe, die leicht zu der Annahme führen könnten, es handele sich nicht um einen, sondern um verschiedene Pilze. Die Größe der Sproßzellen der *Candida tropicalis* schwankt im Durchschnitt zahlreicher Messungen an verschiedenen Stämmen (stets in Bierwürze nach 9 Tagen bei 30° C) im weiten Bereich von 2—13,5 × 3,2—14,8 μ, die der Pseudomycelzellen im Bereich von 1,25—7,4 × 13,8—44 μ. Dabei ist es nicht möglich, eine vorherrschende Durchschnittsgröße der Zellen anzugeben, da alle Größen- und Formenklassen ziemlich gleichmäßig verteilt zu sein pflegen. Während und nach der Gärung bleibt die Bierwürze klar. Von Hautfetzen ist in älteren Würzekulturen bei aufmerksamer Durchsicht öfter etwas zu sehen, häufiger kommen große Mutterzellen, allerdings ohne Häute, vor.

Über das Gesagte hinaus ergab die mikroskopische Untersuchung zahlloser Proben lange keine besonderen Befunde. Auffallend waren gewisse Formen, die regelmäßig wiederkehrten und nicht ohne weiteres zu erklären waren. So waren vor allem die Häute, die ich eben erwähnte, charakteristisch, die freilich weniger regelmäßig an Zellen hingen als bei *Torulopsis pulcherrima*. Wenn sie vorlagen, hingen sie meistens wirklich als Fetzen an den Zellen, entweder offen oder zusammengefallen. Ferner fielen immer wieder längliche Zellen auf, die leer zu sein schienen und, was besonders merkwürdig schien, an der Längsseite in der Mitte offen waren, oft dabei an der Öffnung noch ausgebuchtet.

Es war somit wahrscheinlich, daß ein ähnlicher Sporulationsvorgang vorliegen mußte wie bei *Torulopsis pulcherrima*. Indessen dauerte es lange, bis ich endlich in vereinzelten Häuten noch eine Spore hängen fand. Die Häute mußten daher die Reste früherer Asci darstellen wie bei *Torulopsis pulcherrima*. Aber es blieb unklar, wieviel Sporen der hypothetische Ascus enthielt. Endlich machte ich folgenden

Versuch: Ich ließ soviel von einer 10 %igen Biomalzlösung in die Höhlung eines hohl geschliffenen Objektträgers fließen, daß ein darüber geschobenes Deckglas bis auf eine absichtlich belassene kleine Luftblase die Höhlung völlig abschloß. Es wurde mit Vaseline-Paraffin abgedichtet. Derartige Kulturen ließ ich bei 27° im Brutschrank stehen. Die *Candida* fing an zu gären, was sich an den Kohlensäurebläschen alsbald zeigte. Vom 5. Tage ab fiel auf, daß die kugelrunden gärenden Zellen längliche Tochterzellen gesproßt hatten, deren Inhalt schon, während sie noch an der Mutterzelle saßen, ganz zusammengeballt war, die daher tot zu sein schienen. Diese langgestreckten Zellen waren in der Mehrzahl schon frei geworden. Eine nach der anderen öffneten sich diese Zellen an der Längsseite in der Mitte und entließen langsam Schlieren von Protoplasma, das stark gekörnt und verklumpt war. Aus dem fast undurchsichtigen Zellinhalt traten, manchmal früher, manchmal später, meist nicht gleichzeitig, sondern nacheinander Sporenzellen hervor, die ungewöhnlich stark lichtbrechend waren. In der Minderzahl der Fälle waren die vier Sporen, so viele waren es stets, schon in der Zelle zu sehen.

Wie sich bei Wiederholungen erwies, werden die länglichen von gärenden Zellen gebildet und abgestoßen. In dem verklumpten, scheinbar koagulierten Zellinhalt werden die vier Sporen ausgebildet. Zusammen mit festhaftendem Epiplasma, zu dem sich das Protoplasma der als Ascus fungierenden Zelle umbildet, werden die Sporen entlassen und werden erst nach Stunden bis Tagen von dem Epiplasma frei. Die Sporen quellen dann langsam auf, nehmen an Umfang verschieden zu und werden dadurch ungleich groß. Nach kurzer Zeit beginnen sie zu sprossen und bilden gleich große Zellen, die wie im vorigen Falle wieder eine „kleinzellige Generation" darstellen.

Die sporenbildenden Zellen sind somit als freiwerdende Asci anzusehen. In den gleichen Kulturen tritt zur selben Zeit die Bildung von nicht freiwerdenden Asci auf. Diese entwickeln ebenfalls deutlich vier Sporen. Sie reißen dagegen an dem der Mutterzelle abgewandten Pol, also oben, auf, wo sie dann die Sporen entlassen. Auf Agar habe ich Mutterzellen mit aufgeplatztem leeren Ascus gesehen, an deren Wand noch alle vier Sporen zusammen festklebten. Intakte viersporige Asci sind gut zu sehen in Klatschpräparaten aus jungen Würzeagarkulturen von 3 bis 6 Tagen Alter. Ebenso wie bei *Torulopsis pulcherrima* sind die Sporen durch das Epiplasma nicht immer deutlich zu sehen, auch wenn sie, noch durch Epiplasma verklebt, frei herumschwimmen. Es gelingt allerdings nicht ohne reichliche Übung, die Asci zu entdecken, obwohl sie bei allen von mir untersuchten Stämmen reichlich auftreten. In *Winge-Ranvier*schen Kammern findet man nach 24 Stunden fast lauter Einzelzellen, gleichmäßig groß, sämtlich durch unsichtbare

Schleimschichten getrennt. Auch bei diesem Pilz ergibt die Messung der Zellen nach 24 Stunden kennzeichnende Maße: nämlich 5,2 × 8 μ. Am Rande des Tropfens werden die Zellen unter Einwirkung der Kohlensäure — nicht des Sauerstoffs, wie *Molliard* gefunden hat und wie es *Langeron* und *Guerra* bestätigt haben — merklich dünner und länger: Durchschnittsgröße 3,2 × 8,2 μ. In Agarkulturen findet man öfter Asci, in denen noch eine oder zwei Sporen hängen, ebenso wie bei *Torulopsis pulcherrima* (Abb. 6). Bei Kulturen auf eintrocknendem



Abb. 6. *Candida tropicalis*: Mutterzelle mit geplatztem Ascus und noch 1 einhängenden, schon gequollenen Spore. 2 weitere Sporen kleben an der Mutterzelle. 700 ×.

Agar kann selbstredend kein Epiplasma bemerkt werden wie in eingerissenen Asci. Daß viersporige intakte Asci im Klatschpräparat selten zu sehen sind, habe ich ebenso wie *Okabe* feststellen müssen, obwohl es sich bei mir um eine andere *Candida*-Art handelt. Sicher falsch ist *Okabe*s Angabe, Asci würden nur nach 4 bis 6, frühestens nach 2 Monaten gebildet. Es scheint freilich so, weil die sofort beim Anwachsen der Kolonie einsetzende Ascusbildung dem Beobachter regelmäßig entgangen ist und ihm nur vereinzelte späte Ascusbildungen zu Gesicht gekommen sind.

Nachdem sie sich in der Bildung von Ascis erschöpft haben, entwickeln die Ascusmutterzellen auch dieser Art noch in sich selbst je vier Sporen. Somit hat *Vuillemin*s Auffassung, daß Mutter- und Tochterzelle bei *Candida albicans* (*Vuillemin* nannte seinen Pilz *Endomyces albicans*) Sporen bilden, bei *Candida tropicalis* bestätigt werden können.

Die vorhin schon angeschnittene Frage nach den Kernverhältnissen habe ich zu prüfen angefangen. Bis jetzt hat sich herausgestellt, daß alle vegetativen Stadien durchweg gleichmäßig zweikernig waren, auch große alte Ascusmutterzellen sind es. Die Anordnung der Kerne ist nicht immer die gleiche. In langovalen Zellen liegen sie oft in der Mitte in kurzer Entfernung nebeneinander in Richtung des Schmaldurchmessers. In Pseudomycelzellen ist die Anordnung meist unregelmäßig. In den Blastosporen, aus denen ja fast der ganze Pilzthallus besteht, sieht man sehr oft scheinbar nur einen Kern. Bei genauer Beobachtung gut gelungener Präparate ergibt sich indessen, daß zwei Kerne sehr eng nebeneinander liegen, in manchen Fällen sich wie zwei Apfelhälften aneinanderschmiegend. Nähere Untersuchungen über das Verhalten der Kerne auch weiterer Candideen sollen noch bei Gelegenheit ausgeführt werden.

Die üblichen Methoden der Kernfärbung sind bei den vorliegenden Pilzen nur zum Teil anwendbar. Zu lang dauernde Bäder müssen vermieden werden, da die Pilzzellen nur zu leicht abgeschwemmt werden. Die folgende Färbungsvorschrift hat sich bei *Candida tropicalis* am besten bewährt: Auf entfettetem Objektträger nimmt man die Pilzprobe in wenig Wasser auf, läßt lufttrocken werden, zieht durch die Flamme, stellt eine halbe Minute in Chloroform und nach dessen Verdunsten 2 Minuten in kaltes Wasser. Hierauf hydrolysiert man 5 bis 15 Minuten in normaler Salzsäure bei 60°. Nach kurzem Abspülen der Salzsäure übergießt man (abgeändert nach *Winge-Feulgen*) das Präparat mit alkoholischer Fuchsinlösung. Nach dem Verdampfen des Alkohols oder noch währenddessen gibt man tropfenweise 1 : 6 mit Wasser verdünnten Eisessig zu, so daß das Präparat nicht eintrocknet. Nach 3 bis $3^1/_2$ Stunden ist die Färbung beendet. Jetzt muß sehr sorgfältig mit salzsaurem Alkohol differenziert werden. Nach gründlichem Abspülen mit destilliertem Wasser und Trocknen mittels Fließpapier erscheint in gut gelungenen Präparaten der Kern scharf und deutlich in dunkelrosenroter Färbung, während die Zelle sonst fast farblos ist. Diese Färbung hat auch bei *Torulopsis pulcherrima* die Zweikernigkeit erwiesen.

Schließlich habe ich auch das Verhalten der Ascosporen zu prüfen versucht. Es gelingt jedoch nicht, die Ascosporen allein in Kultur zu bekommen. Stets sind weiterhin ascusbildende Mutterzellen dazwischen und auch vegetative Formen. Es kann nur immer wieder festgestellt werden, daß die Ascosporen sprossen und dabei gleichartige Tochterzellen in großer Zahl erzeugen. Impft man aus einer stark ascosporenhaltigen Kultur ab, so kann man leider nicht ohne weiteres entdecken, was aus den Ascosporen wird: in kürzester Zeit sind wieder vegetative Zellen da, wie wir sie überall finden, die wieder zweikernig sind. Die Ascosporen und ihre Sproßnachkommen stellen somit eine kurze Phase dar, die man wohl als haploid annehmen muß. Wie jedoch die Plasmogamie, die zur Dikaryophase der vegetativen Formen führt, bei dieser Art vor sich geht, konnte nicht ermittelt werden. In Traubenzuckerlösungen, die in dünner Schicht offen in Glasschalen standen und mit *Candida tropicalis* beimpft worden waren, waren nach wenigen Tagen reichlich Ascosporen gebildet. Diese stellten zum Teil ganze Klumpen von kleinzelligen Sproßverbänden dar. An den frischen Ascosporen, teils noch in den Ascis, teils nach ihrer Entlassung, konnte die Größe gemessen werden. Die Sporen sind hier ebenso wie bei *Torulopsis pulcherrima* recht gleichmäßig 2×3 μ groß. Einzelne Sporen, die in eingerissenen Ascis schon begonnen hatten zu quellen, messen 4×5 μ. Demnach verläuft das Leben dieser Candideen hauptsächlich in der Dikaryophase. Die ascogene diploide Phase fehlt somit hier ganz.

Bei den *Candida*-Arten sind die Übergänge zwischen den Formen deshalb so schwer abzugrenzen, weil sie immer und überall Sporen zu bilden vermögen, ganz gleich, ob bei Luftzutritt oder Luftabgeschlossenheit, in Flüssigkeiten oder auf festen Nährböden. Gleichzeitig werden auch noch Sproßverbände und Pseudomycel gebildet, was ein wirres

Durcheinander von Formen ergibt. Bei *Torulopsis pulcherrima* treten die verschiedenen Formen wenigstens einigermaßen getrennt auf und sind morphologisch leichter unterscheidbar. — Die beiden Formen der *Candida tropicalis*, die „forme crémeuse“ und „membraneuse“ von *Langeron* und *Talice* 1932 stellen auch vom Gesichtspunkt der Sporenbildung keine Merkmale dar, die irgendwelche Bedeutung haben für die ersehnte Entdeckung des Entwicklungsganges. Denn Sproßzellen, die als Ascusmutterzellen Asci bilden, können ebensogut von pseudomycelialen Zellen erzeugt werden wie von „gistachtigen“ (= hefeartigen), wie der treffende holländische Ausdruck lautet (*Berkhout* 1923).

Besprechung der Ergebnisse.

Bei den vorliegenden Beschreibungen kam es mir vor allem auf die Wiedergabe der Beobachtungen über die Sporenbildung und derjenigen Merkmale, die für den Entwicklungsgang von Wichtigkeit zu sein scheinen, weniger auf die Fülle vegetativer Einzelheiten an. Die physiologischen Eigenschaften sollen später im Zusammenhang bearbeitet werden.

Das allen *Candida*-artigen Pilzen gemeinsame Leitmerkmal ist das Auftreten der höchst auffallenden, je nach der Art verschieden geformten Hautreste der Asci, die an den Mutterzellen hängen. *Vuillemin* hat sie erwähnt als „éléments tuniqués“. Alle anderen Beobachter haben sie entweder ganz übersehen oder sich mit der Erklärung „Sprossung mit Häutung“ begnügt. Die Ascusbildung durch eine Mutterzelle kann bei beiden Arten mehr als einmal erfolgen. Zuweilen sieht man sogar, daß zwei oder drei leere Ascushäute gleichzeitig an einer Mutterzelle hängen. Für die Betrachtung der Kernverhältnisse ist das wichtig, ebenso wie die Tatsache, daß Chlamydosporen jederzeit auch vegetative Zellen sprossen können.

Wie die Kernfärbungen gezeigt haben, sind die Chlamydosporen zweikernig. Es kann sein, daß diese zwei Kerne den Kernpaaren in den vegetativen Zellen entsprechen, es kann freilich auch sein, daß es sich um zwei diploide Tochterkerne des Zygotenkernes handelt, der durch Verschmelzung des haploiden Kernpaares entstanden ist. Daß die Chlamydosporen jedoch ebenso leicht, wie sie Asci bilden, auch vegetativ weiter sprossen können unter veränderten Außenbedingungen, läßt darauf schließen, daß ihre Kerne noch haploid sind. Durch dies und die übliche Bildung mehrerer Asci nacheinander unterscheiden sich die zwei Pilze von *Taphrina*, der sie sonst in vielem, wie wir gleich sehen werden, sehr ähnlich sind. Bei *Taphrina* fassen *Gäumann* und auch *Dodge* die Chlamydosporen als Zeugiten auf, was sie hier offenbar nicht sind. Die Annahme, daß die Kernverschmelzung erst im Ascus stattfindet, die Diplophase somit nur durch einen Durchgangszustand des

Ascus dargestellt wird, bedarf aber erst noch gründlicher Prüfung. Daß jedenfalls auch bei *Taphrina* die Verhältnisse noch nicht eindeutig erkannt sind, zeigt, daß *Kniep*, entsprechend meiner Annahme, die Kernverschmelzung bei *Taphrina* als im Ascus erst erfolgend annimmt. Die Chlamydosporen gehören also sehr wahrscheinlich — ebenso wie die von ihnen erzeugten Sproßzellen oder Blastosporen — dem Thallus in der Dikaryophase an.

Der Thallus dieser Pilze ist in einander gleichwertige Teile aufgeteilt, fast könnte man sagen, in potenzielle Einzelwesen. Die Aufteilung dient vor allem der Anpassung an die untergetauchte und gärende Lebensweise in kohlenhydrathaltigen Flüssigkeiten. Diese Pilze entfalten eine viel größere Vitalität als alle *Saccharomycetes*, weil sie gewissermaßen eine „doppelte Vermehrung" haben: einerseits durch Sproßzellen (Blastosporen, manche Arten bilden noch außerdem Pseudokonidien, beide aufgezeigt und definiert von *Langeron* und *Guerra*), andererseits durch Ascosporen, die ebensowohl untergetaucht in Flüssigkeiten gebildet werden wie in Oberflächenkulturen auf festen Nährböden.

Von Interesse für die systematische Einreihung der *Candideae* (als Gruppe bisher unbekannter Größe innerhalb der *Candidaceae*, s. unten!) ist die Rolle der Chlamydosporen. Zunächst muß festgehalten werden, daß beide bearbeiteten Pilze solche in großer Zahl bilden. Bei *Torulopsis pulcherrima* fallen sie einem ohne weiteres ins Auge, während sie bei *Candida tropicalis* entweder durch ihre Größe oder gar nicht besonders auffallen. *Langeron* und *Guerra* vermelden von *Candida tropicalis*: keine Chlamydosporenbildung. Sie betrachten solche Chlamydosporen oder Gemmen als Hauptmerkmal von *Candida albicans* und *Candida triadis*, freilich nur vom morphologischen Gesichtspunkt. Sogar morphologisch gesehen, aber erst recht vom entwicklungsgeschichtlichen Standpunkt ist das Vorhandensein von Chlamydosporen bei *Candida tropicalis* dagegen zu bejahen, die oft, wenn auch nicht immer durch ihre Größe und ihre dicke Haut von anderen Zellen zu unterscheiden sind. Die von den zweikernigen Chlamydosporen ausgesproßten Blastosporen bekommen zwei Kerne mit, die als Asci vorgesehenen ebenfalls. Das Verhalten der Kerne im Ascus habe ich leider nicht beobachten können.

Wir stehen nun vor der entscheidenden Frage: Wohin gehören diese Pilze? Vorläufig müssen wir feststellen, daß sie jedenfalls *nicht* zu den *Saccharomycetes* gehören. Von diesen trennen sie folgende Merkmale:

1. Stülpen *Saccharomycetes* keinen Ascus aus, auch nicht in Ausnahmefällen, geschweige denn mehrere nacheinander.

2. Haben *Saccharomycetes* nach bisheriger Kenntnis keine Dikaryophase. Nach *Winge*, der bei *Saccharomyces*-Arten die Kopulation von

Sporen oder deren Nachkommen nachgewiesen hat, verläuft das Leben der *Saccharomyces*-Arten vielmehr in der Diplophase.

3. Ist eine Trennung von Entwicklungsstadien, z. B. ,,dissociation en deux formes" bei *Torulopsis pulcherrima* nach *Porchet* oder ,,kleinzellige Generation" ebendort nach *Lindner* bei *Saccharomycetes* nicht bekannt.

4. Fehlt bei den *Saccharomycetes* die so auffallende Bildung von Epiplasma.

5. Sprossen die Ascosporen der *Candideae* Zellen, die fast gleich groß sind und bleiben, während die Ascosporen der *Saccharomycetes* auskeimen und Zellen erzeugen, die in Form und Größe von ihnen abweichen.

6. Fehlen bei den *Saccharomycetes* die Chlamydosporen = Ascusmutterzellen. Die Chlamydosporen sind innerhalb dieser Pilzgruppe erstmalig von *Grawitz* 1877 bei *Candida albicans* entdeckt worden. Sie sind bei den einzelnen Arten abweichend und ungleich deutlich ausgebildet. Es können Blastosporen oder pseudomyceliale Zellen sein. die eine starke Wand ausbilden, offenbar, um als Dauerorgane gegen Austrocknen und auch chemische Einflüsse besser geschützt zu sein. Die Dauerzellen haben oft, aber nicht immer (*Candida tropicalis!*), Fettkugeln in sich, die durch die aufeinanderfolgende Ascusbildung allmählich verbraucht werden. Sie bleiben lange imstande, unter günstigen Umständen wieder auszusprossen. Gelegentlich kommen auch Dauerformen vor mit Fettanlagerung in der Zellwand, die einen merkwürdigen Anblick bieten. Da sie nur selten auftreten, habe ich sie noch nicht näher untersuchen können.

Charakteristisch für die beiden Pilze ist das Aussprossen der Ascosporen. Die Sprossung als Merkmal einer Gruppe ist hauptsächlich bekannt unter den Vertretern der *Exoascales* und besonders der *Exoascaceae*. Das war für mich der Anlaß, die Ergebnisse von *Wieben* heranzuziehen, die die Entwicklungsgänge von neun *Taphrina*-Arten untersucht und aufgeklärt hat. Ich stelle nun meine Ergebnisse an den beiden bearbeiteten Pilzen und die von *Wieben* an *Taphrina* erhaltenen nebeneinander zum Vergleich:

Taphrina (nach *Wieben*)	*Torulopsis pulcherrima* und *Candida tropicalis*.
Ascosporen sprossen zu zahlreichen gleichgestalteren Tochterzellen, die allmählich größer werden, wodurch eine Population ungleich großer Zellen entsteht.	Dasselbe.
Die Sproßzellen bilden einige haploide dünne Hyphen aus und an deren Ende wieder gleichartige Sproßzellen mit Konidiencharakter.	Fehlt.

Sproßzellen kopulieren (bei *Taphrina epiphylla* und *T. Klebahni*) physiologisch anisogam mit deutlichem Kopulationskanal, indem sie sich mit den Längsseiten aneinanderlegen.	Kopulation wurde nur bei *Torul. pulcherrima* beobachtet: etwas ungleich große Partner legen sich aneinander. Die Wandpartien an der Berührungsstelle lösen sich auf, so daß beide Zellen mit breiter Basis aufeinander sitzen. Der kleinere Partner ergießt sich völlig in den größeren. Die Kopulanten sind Ascosporennachkommen.
Die weibliche „Keimkonidie" (*Wieben*) sproßt Suchfaden aus, der die 2 Kerne stets an der Spitze führt, keine Nahrung aufsaugt, alles Plasma mitnimmt und hinter der Spitze leere Zellen abkammert.	Suchfaden fehlt, was der nicht parasitischen Lebensweise entspricht.
Aus dem Suchfaden wächst in der Wirtspflanze Zweikernmycel.	Aus dem Kopulanten, der nun alles Plasma enthält, entsteht durch Sprossung die erste zweikernige Blastospore, von der aus sich alle dadurch zweikernigen vegetativen Formen entwickeln: Blastosporen, Sproßverbände und Pseudomycel.
Chlamydosporen mit Kernverschmelzung = Zeugiten, die nach Teilung des diploiden Kernes sowie Abtrennung einer Stielzelle selbst zum Ascus werden. Chlamydosporen stets festsitzend!	Freie Chlamydosporen = Ascusmutterzellen, die mehrere Asci nacheinander ausstülpen können. Stielzelle fehlt. Kernverhältnisse noch unsicher.
Im Ascus: 8 Ascosporen. Geschlechtertrennung von *Wieben* bewiesen: 4 Sporen +, 4 Sporen —.	Im Ascus: 4 Ascosporen. Geschlechtertrennung noch unbekannt.

In wesentlichen Punkten als da sind Ascosporensprossung, Zweikernigkeit der vegetativen Stadien, Entwicklung eines nackten Schlauches ohne Lagerbildung, herrscht Übereinstimmung. Diese erstreckt sich auch auf *Taphrina potentillae*, bei der *E. M. Martin* die gleichen Ergebnisse erzielte. Bei *Taphrina potentillae* war die Frage nach der Kopulation der Ascosporennachkommen ähnlich wie bei *Candida tropicalis* nicht sicher zu lösen.

Bei der systematischen Bearbeitung der *Hefen* und der *Endomycetaceae* haben die *Exoascales* bei den neueren Autoren keine Berücksichtigung mehr gefunden. Daß jedoch phylogenetische Zusammenhänge zwischen den *Exoascales* und den *Saccharomycetes* bestehen müssen, ist schon *de Barys* Meinung. *De Bary* schreibt, daß die Formunterschiede zwischen *Saccharomycetes* und denjenigen *Exoascales*, deren Hyphen in Asci aufgeteilt werden, sehr gering sind und daß die Formen-

übereinstimmung vielfach eine schlagende ist. *Sadebeck*, der als erster eingehende Untersuchungen an *Exoascales* angestellt hat, ist der Auffassung, daß mehrere Arten innerhalb dieser Gruppe als Stammformen der *Saccharomycetes* aufgefaßt werden können. *E. C. Hansen* teilt diese Ansicht und unterstreicht die Befähigung der *Exoasceae* zu alkoholischer Gärung. Es ist daher interessant, wenn wir jetzt in den *Candideae* eine neue Gruppe kennenlernen, die für die Klärung mancher Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der *Protascomycetes* brauchbar zu sein verspricht.

Torulopsis pulcherrima stellt noch einen Typ dar, der etwa parallel steht zu den *Taphrina*-Arten. Die Fähigkeit zur alkoholischen Gärung ist vorhanden, die Ascosporentochterzellen sind noch deutlich abgesetzt von den vegetativen Formen, die fast ebenso verschiedenartig sind wie bei den *Candida*-Arten. Letztere unterscheiden sich untereinander deutlich durch morphologische und physiologische Merkmale, jedoch nicht weniger untereinander als von *Torulopsis pulcherrima*, die durchaus als zur Gattung *Candida* gehörig zu betrachten ist. Ich schlage daher die Eingliederung dieser Art in die Gattung *Candida* vor. Auch die Abschnürung von Ascis, die *frei* erst ihre Sporen entwickeln und entlassen, liegt bei den beiden behandelten Arten vor. Ferner auch im Hinblick auf weitere Arten der Gattungen *Torulopsis* und *Candida*, die ich bearbeitet, deren Entwicklungsgang ich aber aus verschiedenen Gründen hier noch nicht hinzugefügt habe, kann man diese ganze Gruppe in der neuen Familie der *Candidaceae* zusammenfassen, die gekennzeichnet ist durch die Ausstülpung eines Ascus aus mehr oder weniger als solche erkennbaren Mutterzellen-Chlamydosporen. Dieser Ascus enthält regelmäßig vier Sporen, die in Epiplasma eingehüllt sind und mit diesem entlassen werden.

Die ganze Gruppe bleibt aber in allen ihren bisher bekannten Formen, auch denen, die ich hier noch nicht besprochen habe, unverkennbar abgetrennt von den *Saccharomycetes*, und zwar durch die Zweikernphase, durch die konstante Sporenzahl, nämlich vier, durch die Ausbildung von Chlamydosporen, die als Ascusmutterzellen fungieren, durch die Fähigkeit, Asci auszustülpen, die nach Art der *Exoasceae nicht* frei werden, und durch das Epiplasma, das die Sporen umgibt und mit ihnen aus den Ascis entlassen wird. Gerade daß beide Möglichkeiten bei mehreren Arten bestehen, sowohl frei werdende wie festsitzende Asci zu bilden, zeigt deutlich, daß es sich bei diesen Pilzen nicht um *Saccharomycetes* handelt, sondern um eine Gruppe, die zu den *Exoascales* gehört, sich aber unter ähnlichen Anpassungsverhältnissen Merkmale entwickelt hat, die ihr Ähnlichkeit geben mit den echten Hefen. Dennoch wird es künftig nicht an Stimmen fehlen, die die Sproßzellnatur dieser Pilze in den Vordergrund stellen und sagen

werden, die sporulierende Hefenzelle sei ja auch nur ein frei gewordener Ascus, daher seien auch die *Candideae* den *Hefen* anzugliedern. Ich betone daher nochmals, daß das maßgebliche Merkmal die Bildung von nicht frei werdenden Ascis ist wie im typischen Falle der *Candida pulcherrima*.

Die *Candideae* sind entwicklungsgeschichtlich ältere Formen als die *Saccharomycetes*, denn die Sporen entstehen in einem Ascus, dessen Entwicklung, auch wenn er frei wird, streng an die Mutterzellen-Chlamydosporen gekettet ist, die z. B. im Falle der *Candida pulcherrima* dem Beobachter durch ihre kolossalen Öltropfen nie entgehen können. Das, was als Bindeglied zwischen *Candida pulcherrima* und der den *Exoasceae* und den *Candideae* gemeinsamen Stammform fehlt, sind Pilze, deren vegetative Phase hauptsächlich mycelial verläuft und die keine freien Asci bilden. Denn der Sproßzellhabitus stellt bereits eine Anpassung an das Wachstum dar auf oder mehr in flüssigen Medien. Als Beispiel hierfür darf besonders *Candida tropicalis* gelten, die auf festen Nährböden vorwiegend festsitzende Asci bildet, während sie unter den Zwangsbedingungen untergetauchten Wachstums einen großen Teil der als Asci vorgesehenen Zellen abstößt, die somit bei Entlassung der Sporen als „frei gewordene Asci“ in Erscheinung treten.

Die bei den *Candideae* festgestellte generative Vermehrung rückt auch die Gattung *Ascoidea* in ein anderes Licht. Man wußte bisher mit den vielsporigen Ascis der *Ascoidea rubescens* ebensowenig anzufangen wie damit, daß hier aus einer Mutterzelle mehrere Asci nacheinander gebildet werden. *Zender* vermutet richtig, daß ein Zusammenhang besteht zwischen den Ascis der *Ascoidea* und den „éléments tuniqués“ des *Vuillemin*schen „*Endomyces albicans*“, nämlich dessen leeren Ascushäuten. In beiden Fällen werden aus einer Mutterzelle mehr als ein Ascus gebildet. Bei *Ascoidea* liegt die Neigung der *Exoasceae* zur Sporensprossung im Ascus ganz ausgesprochen zutage, und es liegt nur zu nahe, *Ascoidea*, obgleich noch mit Vorbehalten, eher als Verwandte der *Exoasceae* und *Candideae* als der *Saccharomycetes* zu betrachten.

Zum Schluß sei noch erwähnt, daß der Milchschimmel, *Oospora lactis*, und andere Arten der gleichen Gattung ebenfalls untersucht wurden, ferner andere Arten der Gattung *Torulopsis* (früher *Torula*, z. B. *Torula utilis*) und der Gattung *Candida*. Die Ergebnisse an diesen ebenfalls sporenbildenden Pilzen sollen, ebenso wie die der physiologischen Versuche, weiteren Veröffentlichungen vorbehalten bleiben. Die Frage der Kernverhältnisse soll im Zusammenhang bearbeitet werden.

Den Damen Frl. Dr. *Diddens*-Baarn (Holland) und Frl. Dr. *Hof*-Delft (Holland), beide am „Centraalbureau voor schimmelcultures“, spreche ich an dieser Stelle für mehrere Auskünfte und freundliche Hinweise meinen besten Dank aus.

Zusammenfassung.

1. Die Bildung von Asci konnte bei *Torulopsis pulcherrima* (*Lindner*) *Saccardo* und bei *Candida tropicalis* (*Castellani*) *Berkhout* festgestellt werden. Die Asci werden von mehr (*Torulopsis pulcherrima*) oder weniger (*Candida tropicalis*) stark gemmenartigen Mutterzellen ausgestülpt. Sie enthalten stets vier Sporen. Die Mutterzellen stülpen gewöhnlich mehr als einen Ascus nacheinander aus. Die in Präparaten aufgefundenen Asci mit ein bis drei Sporen sind immer bereits eingerissen. Die Ascosporenbildung steht in keinem erkennbaren Zusammenhang mit morphologischen Abweichungen: Stämme mit überwiegendem Pseudomycel und solche mit fast nur Blastosporen bilden gleichermaßen Asci und Sporen.

2. Als günstigste Kulturverfahren zur Beobachtung der Ascusbildung wurde einerseits die Züchtung in *Winge-Ranvier*schen Kammern und andererseits die in mit Deckglas durch Vaseline verschlossenen Hohlschliffobjektträgern mit nur einer kleinen Luftblase angewandt. Diese Verfahren dienen jedoch lediglich der leichteren Beobachtung, weil die Reifung der Asci in diesen Kulturen gehemmt wird. Die Sporenbildung tritt in allen festen und flüssigen Medien massenhaft aber meist durch das die Sporen umgebende Epiplasma undeutlich auf. Am leichtesten zu beobachten ist sie bei *Torulopsis pulcherrima,* wo man in jeder 1 bis 2 Monate alten Agarkultur massenhaft Mutterzellen mit ganz oder teilweise entleerten Ascis findet. Leitmerkmal!

3. Der ermittelte Entwicklungsgang ist schematisiert folgender: Die Ascosporen keimen nicht, sondern sprossen sofort aus zu kleinen Tochterzellen. Dann gehen diese bei *Candida tropicalis* auf unbekannte Art in die größeren zweikernigen vegetativen Zellen über. Bei *Torulopsis pulcherrima* wurde die Verschmelzung von Ascosporennachkommenzellen beobachtet. Die Verschmelzung ist eine Plasmogamie ungleicher Partner, bei der der kleinere Partner sich in den größeren ergießt. Sodann wird von diesem eine Tochterzelle gesproßt, die als erste Blastospore der Ausgangspunkt ist für alle vegetativen Formen. Von diesen differenzieren sich bald mehr oder weniger deutlich Chlamydosporen, die bei *Torulopsis pulcherrima* immer, bei *Candida tropicalis* manchmal große Fetttropfen enthalten. Diese können 1. sich durch Blastosporensprossung weiter vermehren und 2. Asci ausstülpen, die a) fest sitzen bleiben und in sich vier kurzelliptische, in Epiplasma eingebettete und dadurch meist schwer sichtbare Ascosporen bilden, schließlich an der Ansatzstelle an der Mutterzelle einseitig einreißen und nacheinander Epiplasma und Sporen entlassen — oder b) frei werden, in gleicher Weise Epiplasma und vier Sporen bilden, aber auf der Längsseite aufgehen und ihren Inhalt entleeren. Die festsitzenden Asci werden überwiegend, aber nicht allein, auf festen Nährböden entwickelt,

während die Asci in Flüssigkeiten vorwiegend, aber nicht immer, frei werden. Die freigewordenen Asci sind meist etwas länglicher als die festsitzenden.

4. Kernfärbungen nach *Winge-Feulgen* mit Fuchsin erwiesen die Zweikernigkeit aller vegetativen Formen sowie der Ascusmutterzellen. Dies sowie das Sprossen der Ascosporen legte den Vergleich mit den *Exoasceae* nahe, der eine weitgehende Übereinstimmung der beiden Entwicklungsgänge ergab.

5. Es wird vorgeschlagen: a) *Torulopsis pulcherrima* fortan in der Gattung *Candida* als *Candida pulcherrima* zu führen und b) alle candidoiden Pilze mit gleichartigen Entwicklungsgängen zusammenzufassen in der neuen Familie der *Candidaceae*, die in die Ordnung der *Exoascales* einzureihen wäre.

Literatur.

Balțatu, Gh., Centralbl. f. Bakt. II, **101**, 196, 1939. — *Bary, A. de*, Morphologie der Pilze. Leipzig, Engelmann, 1884. — *Berkhout, C. M.*, De schimmelgeslachten Monilia, Oospora en Torula. Dissertation Utrecht 1923. — *Castelli, T.*, Diese Zeitschr. **11**, 126, 1940. — *Damm, H.*, Hefen und hefenähnliche Pilze im Säuglingsdarm. Beitrag zur Kenntnis der Gärungsmonilien. Dissertation Kiel 1930, 44 S. Borna-Leipzig, Universitätsverlag von Robert Noske. — *Dodge, C. W.*, Medical Mycology. St. Louis, C. V. Mosby, 1935. — *Gäumann, E.*, Vergleichende Morphologie der Pilze. Jena, Fischer; 1926. — *Grawitz, P.*, Virchows Arch. f. path. Anat. **70**, 546, 1877. — *Grosbüsch, J.*, Centralbl. f. Bakt. II, **42**, 625, 1915. — *Hansen, E. C.*, ebenda II, **1**, 65, 1895. — *Kniep, H.*, Die Sexualität der niederen Pflanzen. Jena, Fischer, 1928. — *Langeron, M.* u. *P. Guerra*, Annales de parasitologie humaine et comparée **16**, 36, 162, 429, 481, 1938. — *Lindner, P.*, Zitiert nach *Lodder*, S. 130—132. — *Lodder, J.*, Die Hefesammlung des „Centraalbureau voor schimmelcultures", Beiträge zu einer Monographie der Hefearten. II. Teil: Die anascosporogenen Hefen. 1. Hälfte. Amsterdam 1934. — *Martin, E. M.*, Bot. Gaz. **98**, 339, 1936. — *Molliard, M.*, C. r. Soc. biol. **119**, 346, 1935. — *Okabe, Y.*, Centralbl. f. Bakt. I, **111**, 181, 1929. — *Porchet, B.*, Ann. de Fermentat **4**, 1938. — *Sadebeck, R.*, Die parasitischen Exoasceen. Eine Monographie. Jahrbücher der Hamburger wissensch. Anstalten **10**, 1—110, 1892. — *Schanderl, H.*, Die mikrobiologischen Grundlagen der Weinbereitung und Früchteverwertung. Stuttgart, Ulmer, 1936. — *Vuillemin, P.*, C. r. Paris **127**, 630, 1898; Les champignons parasites et les mycoses de l'homme. Paris, Le Chevalier 1931. (Encyclopédie mycologique II.) — *Wieben, M.*, Die Infektion, die Mycelüberwinterung und die Kopulation bei Exoasceen. Dissertation Hamburg 1926. — *Windisch, S.*, diese Zeitschr. **9**, 551, 1938. — *Winge, Ö.*, C. r. des traveaux du Laboratoire de Carlsberg, sér. physiologique **21**, 77, 1935. — *Zender, J.*, Bull. Soc. Bot. de Genève **17**, 272, 1925.

Nachtrag.

Die Arbeit von *T. Castelli* (diese Zeitschr. **11**, 126—136, 1940) kam mir erst nach Abschluß vorliegender Darstellung in die Hände. Zu

Castellis mich betreffender kritischer Bemerkung möchte ich nur folgendes betonen:

1. In den letzten 2 Jahren habe ich mehrere Dutzend Stämme *Torulopsis pulcherrima* von Kirschen, Pflaumen, Preßhefe, Brennereihefe sowie von eingemachtem Obst und Johannisbeergelee isoliert, die sämtlich in reinen Kulturen übereinstimmend die gleiche Sporenbildung zeigten.

2. Alle untersuchten Stämme sind fähig, Pseudomycel zu bilden.

3. Die einschlägigen Methoden, um Sporenbildung bei *Saccharomyceten* zu erzielen (Gipsblöcke, Gorodkowaagar usw.), sind ungeeignet bei *Candida* (*Torulopsis*) *pulcherrima* und *C. tropicalis*. Nicht als ob bei diesen Kulturverfahren nie Sporenbildung nach Candideenart festzustellen wäre, sie wird aber zunächst nur dem Geübten auffallen. Das Leitmerkmal zur Feststellung der Sporenbildung nach Candideenart, die leere Ascushaut an der mehr oder weniger auffallenden Mutterzelle, ist auf beliebigen festen Nährböden nach wenigen Wochen aufzufinden. Den Sporenbildungsvorgang beobachtet man dann zweckmäßig in flüssiger Kultur im Hohlschliffobjektträger oder in *Winge-Ranvier*schen Kammern, wie ich beschrieben habe.

4. Da die Farbstoffbildung sich als für den Entwicklungsgang unwesentlich erwies, habe ich ihr bisher keine besondere Beachtung geschenkt.

(Aus dem Laboratorium für Mikrobiologie der König Alexander-Universität in Ljubljana, Jugoslavien.)

Riechstoffbildung bei Schimmelpilzen.

I. Mitteilung:

Biologie der Riechstoffbildung und Orientierung über den Chemismus einiger Pilzriechstoffe.

Von

M. Blinc.

Nach Versuchen von **Heda Krivic.**

Mit 8 Textabbildungen.

(Eingegangen am 2. Oktober 1940.)

Über die Riechstoffbildung bei Schimmelpilzen ist nichts Näheres bekannt. *Thom* (4 a) gibt in seiner Monographie nur an, daß bei manchen dieser Pilze ein Geruch auftritt. Die Bezeichnungen des Geruches, wie streng, aromatisch, schimmelartig, durchdringend u. a., wie sie von verschiedenen Forschern gebraucht wurden, sind miteinander kaum vergleichbar, da die Pilze unter oft ganz verschiedenen Bedingungen gezogen wurden und die Ergebnisse abweichend sein mußten. Etwas mehr findet sich darüber bei *A. Janke* (1) und bei *W. Henneberg* (3a). Nach seinen Angaben riechen die Kulturen von *Penicillium biforme, expansum* (fauliger Apfelgeruch), *claviforme* und *commune* auf allen Substraten, während andere Arten nur auf bestimmten Nährböden einen Geruch erzeugen. *Penicillium digitatum, italicum, decumbens, Nr. 13 Thom* und *claviforme* besitzen z. B. auf Rohrzuckernährböden einen charakteristischen esterähnlichen Geruch.

Wir unternahmen es, diese Frage systematisch durchzuprüfen und geben in der vorliegenden Mitteilung die Erfahrungen mit drei Schimmelpilzen wieder.

Den einen von ihnen, den wir als *Penicillium expansum Link* identifizieren konnten, zogen wir von einer angefaulten Pflaume auf, auf deren Schale mehrere *Penicillium*-Rasen wuchsen. Den zweiten Pilz erhielten wir von einer Eichel, die ohne Schale etwa ein halbes Jahr im Walde auf feuchter Erde gelegen hatte; sie war tief schwarz, aber noch fest. Der dritte Pilz stammt von einem fast in Fäulnis übergegangenen Stück Camembertkäse.

Um eine Reproduzierbarkeit der Versuche und eine kritische Überprüfung zu ermöglichen, wurde die Biologie der Pilze unter sorgfältiger Beobachtung der Geruchsbildung verfolgt. Wir mühten uns, durch

Wechsel der Lebensbedingungen die Geruchsentwicklung möglichst zu steigern, um so eine Isolierung der riechenden Substanz nach gangbaren präparativen Methoden zu ermöglichen.

Die einzelnen Pilzrasen wurden zwecks Gewinnung der Reinkultur auf Dextrose und Saccharoselösungen mit Nährsalzen nach *W. Henneberg* Nr. 2 (3b) angereichert und zur Identifizierung auf verschiedenen anderen Nährböden gezogen.

Der Geruch von *Penicillium expansum Link* ist anfangs unangenehm schimmelartig, später tritt eine Mischung von Fruchtaroma und leichtem Schimmelgeruch auf. Zu einem bestimmten Zeitpunkt beobachtet man nur einen ausgeprägten Obstgeruch, am ehesten nach Äpfeln.

Das von der Eichel gezogene *Penicillium* entwickelt in jungen Kolonien ein champignonartiges Aroma, welches bald angenehm und erfrischend-harzig, und bei Kulturen auf Saccharoselösungen schließlich stark kampferartig wird. Auch bei dem Käseschimmel konnten wir anfangs den Geruch nach Champignon nachweisen; später hatten die Kulturen den ausgeprägten Edelgeruch des Roquefortkäses.

Es ist bemerkenswert, daß sich der angenehme Geruch bei allen drei Pilzen erst in jenem Entwicklungsstadium entwickelt, in dem Dauerzellen in größerem Maße auftreten. Diese Veränderung des Entwicklungszustandes kann man nicht nur mikroskopisch verfolgen, sondern sie kann bei *Penicillium expansum Link* sowie bei dem von der Eichel gezogenen *Penicillium* mit freiem Auge erkannt werden. Das Pilzmycel wird nämlich zu diesem Zeitpunkt orangerot gefärbt. Bei unserem Käseschimmel sind die Dauerzellen in geringerer Menge vorhanden, nicht gefärbt und daher mit freiem Auge nicht leicht erkennbar.

Die Reinkulturen wurden auf Reisnährböden, die ebenfalls die *Henneberg*schen Nährsalze Nr. 2 enthielten, bereitgehalten.

Besondere, bei verschiedenen Temperaturen ausgeführte Kulturversuche auf *Henneberg*scher Saccharose- und Dextroselösung in Erlenmeyer-Kölbchen von 250 ccm haben gezeigt, daß alle drei in Betracht kommenden Pilze in Temperaturintervallen von 18 — 27° C fast gleich gut gedeihen. Bei Temperaturen oberhalb 30° C nimmt das Wachstum schnell ab und bleibt oberhalb 35° C gänzlich aus. Temperaturen von 12 — 15° C ermöglichen nur ein wesentlich langsameres Wachstum.

Innerhalb der Grenzen von $p_H = 5{,}5$ bis $p_H = 8{,}04$ gedeihen alle drei Pilze gleich gut. Wir hatten daher keinen Grund, von der *Henneberg*schen Lösung mit einem $p_H = 5{,}58$ abzugehen.

Bei den Versuchen mit verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen diente uns als Grundlage die Pilzlösung Nr. 2 nach *Henneberg*. Diese enthält neben Neutralsalzen primäres Kaliumphosphat, dessen p_H-Wert 5,58 ist. Um andere Wasserstoffionenkonzentrationen ohne wesentlichen Wechsel der beteiligten Ionen zu erzielen, verfuhren wir folgendermaßen: Durch teilweisen Ersatz des primären Kaliumphosphats durch sekundäres Kaliumphosphat erhielten wir Puffermischungen mit dem gewünschten p_H-Wert; da sich hierdurch die relative Kaliummenge erhöht, verminderten wir das Kaliumnitrat. Den nun gesunkenen Nitratstickstoff

Tabelle I. Zusammensetzung der Pilzlösung bei verschiedenem p_H-Wert in Gramm je Liter.

	p_H = 5,58	p_H = 6,64	p_H = 7,38	p_H = 8,04
KH_2PO_4	0,93024	0,5848	0,1958	0,06256
K_2HPO_4	0.06264	0,50102	1,0022	1,18416
KNO_3	1,8786	1,7710	1,313	1,24230
NH_4NO_3	0,0160	0,1200	0,5280	0,60660
$MgSO_4$	0,49700	0,49700	0,49700	0.49700
$CaCl_2$	0.110	0.110	0.110	0.110

ersetzen wir durch Ammoniumnitrat, wobei wir beide Stickstoffatome als ernährungsphysiologisch gleichwertig betrachteten, so daß für 1 Mol Kaliumnitrat 0,5 Mol Ammoniumnitrat in Betracht kam. Das Magnesiumsulfat und das Calciumchlorid blieben unverändert. Die Zusammensetzung der Nährsalzlösungen für die von uns verwendeten p_H-Werte mit einigen Umrechnungsdaten sind aus der Tabelle I ersichtlich.

Die so zusammengesetzten Pilzlösungen weichen bei nachträglicher Überprüfung des p_H-Wertes mit dem *Merck*schen Universalindikator nur um einige Zehntel vom berechneten p_H-Werte ab. Die Versuche wurden in Erlenmeyer-Kölbchen in Wasserthermostaten bei 25° C ausgeführt und ungefähr 3 Wochen bezüglich des Wachstums und der Geruchsentwicklung beobachtet.

In einigen Versuchsreihen, in denen wir das p_H variiert hatten, wurde nach dem Abbrechen des Kulturversuches im Substrat die Zuckermenge nach der Methode von *Auerbach-Bodländer* bestimmt. Die beiden Penicillien haben innerhalb der eingehaltenen Versuchsdauer (21 — 24 Tagen) nahezu 90 — 95 % des ursprünglich verfügbaren Zuckers verbraucht. Bei den Versuchen mit dem Käseschimmel dagegen fanden wir nach der gleichen Zeit noch 68 — 75 % Zucker wieder.

Um die zur Isolierung des Riechstoffes notwendigen großen Pilzmengen zu erhalten, zogen wir die einzelnen Pilze bei 20 — 22° C unter Lichtzutritt auf *Henneberg*scher Saccharoselösung Nr. 2 in gläsernen photographischen Schalen (24 × 30 cm) bzw. in runden hohen Glasschüsseln ($2r$ = 25 cm, h = 12 cm). Die Kulturgefäße waren mit Glasplatten bedeckt. Während beim Pflaumenschimmel und beim Eichelschimmel beide Arten der Kulturgefäße mit gleich gutem Erfolge verwendet werden konnten, erwiesen sich beim Käseschimmel die runden hohen Schalen als weniger günstig, da der Luftzutritt zum Rasen infolge der tieferen Lage gehemmt war.

In 2 — 3 Wochen erreichten die Kulturen den Höhepunkt der Geruchsentwicklung. Zu dieser Zeit wurde der Pilzrasen aus dem Substrat gehoben und noch feucht in einer Reibschale mit oder ohne Quarzsand zu einem Brei verrieben. Man verhindert hierdurch das lästige Überfließen der leichten, auf der Oberfläche schwimmenden Konidien in das Extraktionsgefäß. Für die Extraktion des Riechstoffes ist die Zerkleinerung jedoch nicht wesentlich. Die Substrate wurden stets auf eventuelle Infektionen geprüft; für die chemische Untersuchung wurden nur einwandfreie Kulturen verwendet.

Aus einem Teil dieser Masse wurden die Riechstoffe mit Wasserdampf übergetrieben, aus einem anderen Teil in Soxhlet-Apparaten mit Äther extrahiert.

Bei der Wasserdampfdestillation wich der angenehme Geruch der beiden Penicillien einem unangenehmen Geruch nach organischen Zersetzungsprodukten. Wohl aber ging das natürliche Aroma des Käseschimmels mit dem Wasserdampf unverändert über. Bei Änderung der von Natur aus schwach sauer reagierenden Pilzmassen durch Laugen- oder starken Säurezusatz wurde das eben genannte Verhalten in keiner Weise beeinflußt. Die Destillate reagierten in allen Fällen, und zwar auch bei fraktioniert ausgeführten Wasserdampfdestillationen, neutral.

Die Extraktion mit Äther lieferte bessere Ergebnisse. Die gewonnenen ätherischen Lösungen waren bei allen drei Pilzen schwach gefärbt und besaßen den guten Geruch der Pilzkulturen, welcher trotz Äthergegenwart gut wahrnehmbar war.

Zwecks Orientierung über die Zugehörigkeit der Riechstoffe zu bestimmten organischen Stoffgruppen führten wir bei sorgfältigster Beobachtung von Geruchsveränderungen folgende Reaktionen aus:

1. Verhalten der Extrakte zu Wasser, Säuren und Laugen.
2. Verhalten dieser Lösungen beim Erwärmen.
3. Wasserdampfdestillation der neutralen Lösungen.
4. Verhalten der Wasserdampfdestillate zu Laugen und Säuren.
5. Lösen der Extrakte in Alkohol.
6. Reaktion mit alkalischer Silberlösung.
7. Einwirkung von Bromwasser.
8. Einwirkung von konzentrierter Lösung von Natriumbisulfit.

Einzelheiten über die betreffenden Beobachtungen sind bei den Beschreibungen der Pilze angeführt. Hier sei vorweggenommen, daß die Riechstoffe von *Penicillium expansum Link* und des *Penicillium* aus der Eichel Esternatur haben, der Riechstoff des Käseschimmels aber in die Gruppe ungesättigter Ketone gehören dürfte.

1. Penicillium expansum Link.

Das Wachstum dieses Pilzes verfolgten wir auf folgenden Substraten: *Henneberg*sche Nährsalzlösung Nr. 2 mit Saccharose-, Dextrose-, Maltose-, oder Lactosezusatz, Würze, (2, 3c) Fleischwasser, Milch, *Raulin-Dierck*sche Gelatine, Mais- und Bohnenagar, Kartoffelbrei und Reis mit *Henneberg*scher Nährsalzlösung Nr. 2.

Auf den verschiedenen flüssigen, zuckerhaltigen Substraten wächst der Pilz sehr rasch, besondere Wachstumsunterschiede von Substrat zu Substrat haben wir nicht beobachtet. In den ersten Tagen nach der Impfung ist die Ober- sowie die Unterseite des Pilzgewebes vollkommen weiß. Nach etwa einer Woche sind die runden zusammenhaltenden Kolonien von einer Größe bis zu 1 cm grün und plüschartig geworden und besitzen einen breiten weißen Rand (Abb. 1). Die grüne Farbe schlägt dann ins Graugrüne über und bleibt so wochenlang erhalten.

Der weiße Saum ist flaumig und umgibt die runden Kolonien wie ein erhabener Gürtel. Aus diesem entwickeln sich unzählige Koremien auf kurzen, dicken Stielen mit kugelartigem Kopfe, der für das

Auge nur undeutlich geformt erscheint. Sehr oft färbt sich der Saum samt den Koremien lachsrosa. Diese Farbe kann im Alter in ein scharfes Orange übergehen. Die Einzelkolonien treten häufig zu Gruppen zusammen, doch bleiben ihre Grenzlinien erhalten. Die Oberfläche der Kolonien ist größtenteils konvex, mitunter auch länglich gerollt.

Das Substrat verfärbt sich erst nach Wochen leicht gelb.

Im Laufe der Entwicklung wird die anfänglich weiße Unterseite der Pilzdecke gelb, dann orange, und schließlich braunrot. Nach etwa





Abb. 1. *Penicillium expansum Link* auf Saccharose.
a 10 Tage alt — b 20 Tage alt
(Natürliche Größe.)

10 Tagen erhält die Kultur ihr normales Aussehen. Der jeweiligen Wachstumsgeschwindigkeit entsprechend können aber auch Abweichungen eintreten. Wir konnten Kolonien heranziehen, die zwar oben schnell grün, unten aber nur langsam orange wurden, auch beobachteten wir Kulturen, die sehr bald das orange gefärbte Pilzgewebe besaßen, den grünen Konidienrasen jedoch nicht gleichzeitig bildeten. In diesem Falle war die Kolonie auch auf der Oberfläche orange gefärbt. Unter der Pilzdecke entwickelten sich schleimige, meistens im Substrat frei schwimmende, schmutzig-weiß bis braunrot gefärbte Gewebemassen, die das Substrat mitunter trübten. Bei kräftigem Wachstum tritt der Schimmelgeruch schon in den ersten Tagen auf, er verändert sich aber, wie erwähnt, in eine Mischung von Fruchtgeruch und

Schimmel. In zwei Wochen ist nur mehr der Fruchtgeruch wahrzunehmen, den die Kolonie durch Wochen hindurch beibehält. Bei sehr alten Kulturen tritt der Schimmelgeruch wieder in den Vordergrund und schließlich verschwindet auch dieser.

Auf Milch ist das Wachstum ähnlich; die Milch selbst wird in einer Woche unter Bildung einer bräunlichen Flüssigkeit zersetzt, auf der klumpenförmige Gerinnsel mit der Pilzkultur schwimmen.

Der beschriebene Wachstumsvorgang des Pilzes kann in seinem Anfangsstadium eine Veränderung erfahren. Ab und zu gelang es uns nämlich, nach Impfung von Konidien in *Henneberg*sche Schimmelpilzlösung Nr. 2 Kulturen zu ziehen, die zeitweise nur aus Mycel und Stielgemmen bestanden. Die obere sowie untere Färbung der Kolonien war in diesem Falle scharf orange und die Kulturen zeigten die erwähnten rolleartigen, länglichen Formen. Es ist wichtig, daß diese Kulturen geruchlos waren, oder nur einen geringen Schimmelgeruch besaßen. Die Entwicklung des Fruchtgeruches bemerkten wir erst dann, wenn sich auch bei diesen Kulturen ausgiebige Konidienbildung einstellte. Versuche, wohlriechende Kulturen ohne Dauerzellen zu ziehen, mißlangen durchwegs; auf festen Substraten war ihre Anzahl zwar immer gering und der entsprechende auftretende Fruchtgeruch schwächer, doch ihre völlige Abwesenheit konnten wir bei älteren Kulturen nicht nachweisen.

Auch auf den festen Nährmaterialien wächst der Pilz gut. Er bildet besonders auf Gelatine und Agar breite, mit dem typischen Rand versehene Kolonien. Die reingrünen Konidien bedecken schließlich die ganze verfügbare Oberfläche des Substrats mit einer stumpfgrünen Rasendecke. Auch hier ist — wie wir es in dünn aufgetragenen Agarschichten beobachten konnten — die Unterseite des Pilzfleisches leicht orange gefärbt. Die Koremienbildung kommt auf festen Substraten weniger zum Ausdruck und unterbleibt manchmal vollends. Der Wohlgeruch trat bei Reiskulturen auf, deren Rückseiten sich langsam gelblich-braun färbten. Gelatine wurde nach 7 Tagen bei Zimmertemperatur verflüssigt.

Schon auf Grund dieser Beobachtungen glaubten wir, *Penicillium expansum Link* in der Hand zu haben. Der im folgenden angegebene mikroskopische Befund hat diese Annahme bestätigt.

Es handelt sich um einen Pinselschimmel [*Thom*scher Bestimmungsschlüssel (4b)], dessen Konidienstiel sich an seinem Ende in zwei ungleich lange Träger teilt, die ihrerseits wieder in neue Trägerformen und Sterigmen übergehen (Abb. 2). Die Konidien sind öfters in Reihen angeordnet, sitzen aber manchmal auch dicht gedrängt und wahllos nebeneinander, wobei der Schimmelkopf eine Besen-, Hand-, oder Krallenform annimmt.

Die Hyphen zeigen verschiedene Länge; die Konidien sind oval bis rund, haben einen glatten Rand und sind leicht strukturiert. Ihre Größe schwankt zwischen (2 — 3) : (3 — 4) μ (Abb. 2).

Die unter dem Konidienrasen orange gefärbte Pilzmasse setzt sich aus einem dicht verflochtenen, sehr zähen Mycel zusammen. Bei

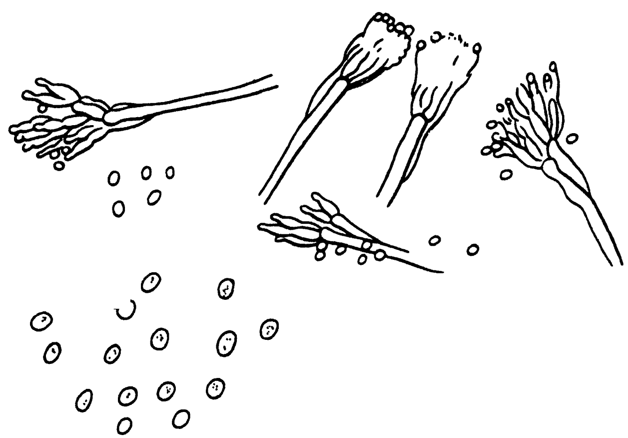


Abb. 2. Konidien und Fruchtstände von *Penicillium expansum Link*. (Konidien 1200 × vergr., Fruchtstände 720 × vergr.)

der mikroskopischen Untersuchung konnten wir zahllose Verdickungen nachweisen, die entweder einzeln oder zu Gruppen versammelt ein unlösbares Wirrwarr von Gewebsteilen und Knoten darstellen. Die oval, rund oder beliebig geformten Verdickungen sind rotbraun gefärbt, ihr Inneres stark strukturiert und mit körnchenartiger Substanz gefüllt (Abb. 3).

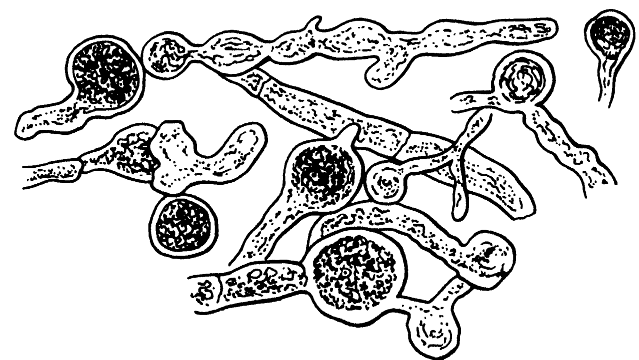


Abb. 3. Dauerzellen von *Penicillium expansum Link* (1200 × vergr.), Inhalt rotbraun.

Die Strukturierung läuft nicht bis zum äußeren Rand der Gewebszellen selbst, sondern bildet in ihr einen genau begrenzten Kreis. Die beschriebenen Zellformen erwiesen sich bei unseren Beobachtungen

immer als äußerst große Gebilde, die sich in dieser Form auch weiter vermehren konnten. Bei Beimpfung der Substrate mit den Gewebszellen aus dem roten Pilzmycel entwickelten sich anfangs nur vegetative Hyphen mit den erwähnten gemmenartigen Verdickungen und rotbrauner Färbung. Der auch hier auftretende Schimmelgeruch ging in den Fruchtgeruch erst über, sobald reichliche Konidien gebildet wurden. Dies geschah bei Zimmertemperatur frühestens in 14 Tagen.

Für die chemischen Untersuchungen verarbeiteten wir im Laufe der Arbeit die Pilzmasse von ungefähr 30 Schalenkulturen. Da wir kleine Destillations- und Extraktionsgefäße vorzogen, kam für je eine Wasserdampfdestillation oder Ätherextraktion nur die halbe Pilzmasse aus einer Schale zur Verwendung. Die Wasserdampfdestillation dauerte 2 Stunden, die Ätherextraktion 6 Stunden. Das Wasserdampfdestillat war vollkommen farblos und klar, der feine Fruchtgeruch war neben dem unangenehmen Geruch eben noch wahrnehmbar. Dieser bleibt bei Säure- und Basenzusatz sowohl in der Kälte als auch in der Wärme bestehen. Das Wasserdampfdestillat enthielt stark reduzierende Substanzen (Silberspiegelprobe), Bromwasser wurde entfärbt. Der graubraune Destillationsrückstand roch nach ausgekochten Schwämmen.

Auch bei der Ätherextraktion änderte sich die Farbe des Pilzfleisches. Meist wurde es schmutzig-braungrün, hie und da rostrot. Der rohe Ätherextrakt, in dem sich der in Frage stehende Riechstoff unverändert vorfindet, stellt eine dunkel-rotbraune, dicke Flüssigkeit dar, mit klumpigen festen Teilchen, die Fettnatur tragen. Man kann diese durch Filtration über Filterpapier entfernen, wobei sich im Filtrat der Riechstoff ungeschwächt wiederfindet. Bei der Wasserdampfdestillation dieser Riechstofflösungen gehen anfangs noch wohlriechende Teile über, später hat das Destillat den bereits bei anderen Gelegenheiten beobachteten unangenehmen Beigeruch. Die anfangs destillierenden Fraktionen reagieren schwach sauer. Für die Beurteilung des Chemismus ist die Tatsache wichtig, daß der üble Geruch des Destillates nach Laugenzusatz in der Kälte verschwindet, so daß der anfangs überdestillierte Riechstoff wieder bemerkbar wird.

Die wässerige Lösung des Ätherextraktes verliert den edlen Geruch allmählich auch bei Gegenwart von Lauge oder Säure in der Kälte, sie bleibt aber nach Zusatz von Natriumbisulfit unbeeinflußt.

Diese Beobachtungen sprechen für die Annahme, daß der Riechstoff von *Penicillium expansum Link* Esternatur hat. Der Ester wird während der Wasserdampfdestillation allmählich verseift; es destilliert dann mit dem Wasserdampf die übelriechende Säure über, deren Geruch nach der Neutralisation verschwindet. Die Säure scheint ungesättigt zu sein, da das Wasserdampfdestillat Bromwasser rasch entfärbt.

Die im Wasser ungelöst gebliebene halbfeste Masse des Ätherextraktes erzeugt auf Papier Fettflecke, löst sich in Alkohol und geht beim Erwärmen mit Lauge in Lösung.

2. Das von der Eichel gezogene Penicillium*.

In analoger Weise wurde die Biologie des von der Eichel aufgezogenen wohlriechenden Pilzes verfolgt. Auf den flüssigen zuckerhaltigen Substraten sind die auftretenden Kulturen anfangs auf der Ober- sowie Unterseite nahezu weiß. Sie setzen sich aus unzähligen kleinen, bröselartigen Kolonien zusammen, die der Fläche nach nicht größer werden, wohl aber an der Peripherie neue kleine Kolonien ansetzen. Schon nach 2 Tagen kann man die Verfärbung der oberen Pilzmasse in ein schwaches Graugrün bemerken. Gleichzeitig treten an der Unterseite leicht orangegefärbte Flecken auf. Nach 4 bis 5 Tagen wird auch das Substrat gelblich. Diese Verfärbung nimmt zusehends zu und erreicht in einer Woche einen citronengelben Ton, der dauernd hält. Bei sehr alten Kulturen tritt eine Trübung des Substrates ein, die sicherlich nicht auf bakterielle Infektion zurückzuführen ist. Während die Kolonien anfänglich einen schmalen weißen Rand besitzen, geht dieser Rand später verloren und die ganze Kultur ist einheitlich graugrün gefärbt (Abb. 4).





Abb. 4. Eichelschimmel auf Saccharose.

a: 7 Tage alt, grünlich, mit weißen Büscheln (schwarze Unterlage).

b: 14 Tage alt, graugrüne Kolonien, Substrat gelb.

(Natürliche Größe.)

* Im Laufe dieses Textes soll dafür der Ausdruck: Eichelschimmel gebraucht werden, da wir uns infolge der vielen öfters voneinander abweichenden Literaturangaben für keinen bestimmten Namen entscheiden konnten. Auf Grund unserer Untersuchungen würde der Pilz zur Varietät des *Penicillium granulatum* einzureihen sein.

An einigen Stellen sind sekundäre Hyphenbildungen in leicht grauer Farbe gut bemerkbar. Die gebildeten Konidien verleihen dem Pilz ein puderartiges Aussehen. Die Pilzmasse ist zu dieser Zeit an der Unterseite mit zahllosen, bis etwa zu $^1/_2$ cm breiten orange gefärbten Flecken besät, die in die gelblich getönte Pilzdecke gelagert sind. Unter der Pilzmasse haften oder schwimmen frei im Substrat schleierartige, orange gefärbte Gebilde.

Auch dieser Pilz ist durch Koremienbildung gekennzeichnet, welche jedoch auf flüssigen Substraten weniger zum Ausdruck kommt als auf festen. Die Koremien sind sehr dünn und verleihen der Kultur durch ihre weiße Farbe ein wie mit Raulreif bedecktes Äußeres. Hier und da schlägt die Farbe der Unterseite durch die Masse nach oben, so daß man auch an der Oberfläche orange gefärbte Stellen sehen kann. Als ein besonderer Fall sei das Wachstum des Pilzes auf Milch erwähnt, die nach 1 bis 2 Wochen zu einer gänzlich roten, fast klaren Flüssigkeit gelöst wird, während die Pilzmasse auf der Flüssigkeit schwimmt.

Der Geruch des Pilzes wird schon nach 3 bis 4 Tagen merklich. Er ist zuerst champignonartig und wird nach 10 bis 14 Tagen angenehm harzig, oft kümmelartig. Bei einigen Kulturen auf Saccharoselösung steigerte sich der Geruch bis ins campherartige. Die Geruchsbildung verlief parallel mit der Gemmenentwicklung im Pilzmycel. Auch hier konnten wir bestätigen, daß der angenehme Harzgeruch nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von Konidien und Dauerzellen auftritt. Wir konnten bei auftretendem Geruche stets die Gegenwart von verdickten Dauerzellen bestätigen. Versuche, die Gemmen als eigene Kultur zu ziehen, ergaben Kolonien, die verhältnismäßig viel Gemmen und wenig Fruchtstände aufwiesen; doch entwickelte sich schließlich auch in solchen Fällen der Pilzrasen in graugrüner Farbe.

Die Entwicklung des Pilzes auf festen Substraten lief hauptsächlich in der Richtung der Konidienbildung; es entsteht ein grüner Rasen mit unzähligen weiß gestielten Koremien. Im Alter schlägt die Farbe in ein stumpfes Graugrün über und bleibt auch nach wochenlangem Stehen der Kulturen unverändert. Auf gedämpftem Reis mit Nährsalzzusatz entwickelten sich die Koremien besonders schön. Ihre Form sowie Größe konnte daselbst mit freiem Auge geschätzt werden (bis 3, sogar 4 mm hohe Stäbchen, weiß gefärbt, mit grünem Kopfansatz). Unmittelbar unter dem Pilzmycel liegende Reiskörner werden rotbraun. Der harzige Geruch ist daselbst deutlich erkennbar. Es riechen auch die Kulturen auf Mais- und Bohnenagar.

Die Konidien dieses Pilzes (Abb. 5) sind rundlich mit einem Durchmesser von 2,5 — 3.5 μ. Der Rand ist etwas gezackt und das Innere fast strukturlos. Die ausgebildeten Konidienträger sind dicht gedrängt, verschieden hoch und unregelmäßig verzweigt (Abb. 5). Der Konidienstiel teilt sich an seinem Ende in zwei Konidienträger, die ihrerseits wieder in neue

Träger übergehen; die eigentlichen Sterigmen mit den Konidien entwickeln sich erst an diesen. Das Bild dieses Pinselschimmels im Mikroskop kann demnach ein sehr verschiedenes sein, da die eben geschilderte Form der Fruchtstände sehr variabel ist. Nicht selten wurden sehr verzweigte Konidienträger mit vielen Sterigmen beobachtet, so daß der Pilz ein pinienartiges Aussehen besitzt.

Die rötlich gefärbte Unterseite des Pilzmycels setzt sich aus einem dicht verzweigten Mycelnetz zusammen. In diesem tragen die septierten Hyphen an ihren Enden häufig verstärkte Gewebszellen und

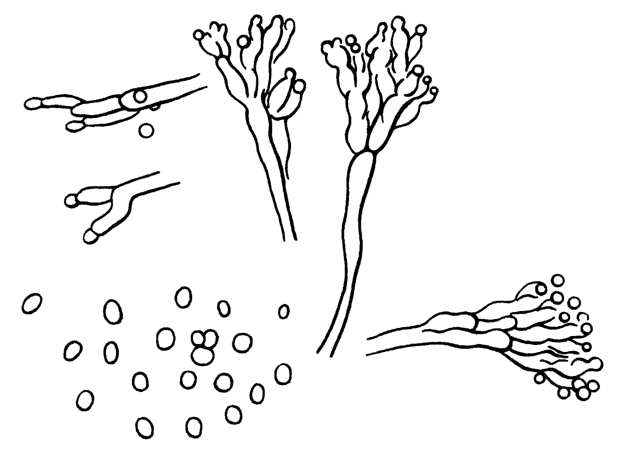


Abb. 5. Konidien und Fruchtstände vom Eichelschimmel. (1200 × vergr.)

weisen auch in ihren mittleren Teilen kugelartige Gebilde auf. Diese endständig, sowie in der Hyphe selbst auftretenden Verdickungen sind sehr strukturiert und rötlich-braun gefärbt. Die Färbung lief häufig teilweise auch in die benachbarten Gewebsteile über und flaute langsam mit deren Entfernung von der Gemme ab. Die Menge und Größe der Gemmen nahm mit dem Alter der Pilzkultur, namentlich beim ruhigen Stehen zu. Im allgemeinen waren sie nicht sehr groß und traten zu keinen Anhäufungen zusammen.

Zur Orientierung über das chemische Verhalten des Riechstoffes dieses Pilzes verfuhren wir analog wie bei *Penicillium expansum Link.*

Das aus der Pilzmasse erhaltene Wasserdampfdestillat hatte einen unangenehmen Geruch. Der Ätherextrakt war dunkel-rotbraun gefärbt, salbenartig mit einzelnen, wie Kriställchen aussehenden festen Partikelchen. Sein kalter wässeriger Auszug besaß den ursprünglichen Wohlgeruch, dieser ging bereits beim Erwärmen auf 50° C verloren. Der Riechstoff wird durch Säure oder Lauge in der Kälte zerstört, wobei ein übler Geruch auftritt.

Bei der Wasserdampfdestillation geht anfangs der Riechstoff unverändert über. Das Destillat ist sauer. Die nachfolgenden Anteile

riechen unangenehm ranzig. Dieser Geruch verschwindet bei Zugabe von Alkali; Bromwasser wird entfärbt, Natriumbisulfit schwächt den Geruch etwas ab.

Wir haben es demnach auch hier mit einem Ester einer vermutlich ungesättigten Fettsäure zu tun.

3. Scopulariopsis.*

Diesen Pilz zogen wir, wie bereits erwähnt, von einem schon teilweise zerfallenden Stück Camembertkäse auf. Es reiften blattgrüne Konidienrasen heran, die uns das Ausgangsmaterial für die Weiterzucht bildeten. Der Pilz entwickelt sich schnell und gut. Er bildet auf zuckerhaltigen, flüssigen Substraten vorerst weiße, schleierartige Kolonien, die nach 2 Tagen schon die ganze Oberfläche des Substrats überziehen. Diese Pilzdecke ist gallertig und zusammenhaltend, so daß man sie mit einer Nadel als Ganzes herausheben kann. Die Farbe ist milchig weiß, das Substrat bleibt klar. An einigen Stellen bilden sich flockige, mit langen Hyphen bedeckte, anderswo wieder plüschartige Einzelkolonien aus. Nach 3 bis 4 Tagen bemerkt man beginnende Konidienbildung. Die Konidien sind anfangs leicht grün gefärbt und treten an den Rändern der Pilzdecke auf. Sie werden später vorwiegend spinatgrün und sind auch bei vollendeter Reife tief spinatgrün gefärbt. Die Unterseite der Pilzmasse bleibt auch im Alter weiß und wird nur selten etwas gelblich.

Wir konnten durchwegs beobachten, daß die Konidienbildung schwach war oder ausblieb, sobald die Pilzdecke mit der Luft nicht genügend in Berührung kam. So konnten wir die Konidienbildung durch mehrmaliges, kurzes Öffnen der Kulturgefäße oder durch Schütteln derselben fördern. Die Konidien entwickelten sich insbesondere auf den dadurch entstandenen Falten und Biegungen in der Pilzdecke und verliehen der Kultur ein marmoriertes Aussehen (Abb. 6). Wenn hingegen die Kulturgefäße ruhig stehen gelassen wurden, mußten wir 2 Wochen und länger auf das Auftreten der grünen Konidien warten, die sich auch dann nur schwach, an einzelnen Stellen und niemals zu einer zusammenhängenden grünen Decke entwickelten. Bei zu geringem Luftzutritt bot der Pilz das Bild eines weißen Rasens, der zeitlich unverändert blieb. Ein zur Identifizierung herangezogenes Tropfenpräparat zeigte starkes Wachstum gegen die Außenränder zu, so daß

* Nach *Ch. Thom* (4c) treten die *Scopulariopsis*-Arten gewöhnlich bei Zersetzungsvorgängen auf. *Thom* isolierte sie aus vielen alten Käsesorten und fand sie insbesondere in Camembertkellern. Die von uns beobachteten mikroskopischen Eigenarten stimmen mit den Angaben von *Thom* überein. Hinweise auf einen Edelgeruch nach Roquefortkäse finden sich dort nicht; wohl aber wird betont, daß viele Vertreter dieser Gruppe amoniakalischen Geruch besitzen. Wir beobachteten an sehr alten Kulturen den bekannten intensiven Geruch nach Carbylamin.

der Pilz schließlich das Deckglas überwuchs. Zu ausgebildeten Fruchtständen kam es nicht. Daher wurde dieses *Penicillium* beim Ziehen im großen nur in flache Wannen geimpft.

Der Geruch entwickelt sich verhältnismäßig bald. Schon in den ersten Tagen ist er champignonartig, in den folgenden Tagen tritt der feine Geruch nach Roquefortkäse rein auf. Während bei den früher beschriebenen Penicillien der edle Geruch an das gleichzeitige Vorhandensein einer großen Menge Gemmen und Konidien gebunden war, trat hier der Edelgeruch bei verhältnismäßig geringer Zahl von Gemmen und Konidien auf. Der gute Geruch dieses Schimmels schwächt nach einiger Zeit, hauptsächlich bei Substratmangel ab und verschwindet im allgemeinen schon nach 2 Wochen. Ein wesentlicher Unterschied im Wachstum auf verschiedenen flüssigen Nährsubstraten war nicht zu bemerken. Auf Milch wächst der Pilz zu einer dicklich weißen Kolonie heran, die Milch verflüssigt sich und verfärbt sich nach Wochen zu einer fast klaren braunen Flüssigkeit, wobei der Geruch erhalten bleibt.



Abb. 6. *Scopulariopsis* auf Saccharose. Weißer Rasen mit grünen Strichen und Zonen. (Natürliche Größe.)

Auf den in Betracht kommenden festen Nährböden behält der Pilz sein charakteristisches Aussehen bei. Bei Luftmangel bildet er nur schwer seine grünen Konidienrasen. Sein Geruch entwickelt sich besonders gut auf Reiskulturen, woselbst man ihn viele Wochen verfolgen konnte.

Die jungen Kolonien zeigen Hyphen mit starker Strukturierung. Deren Innensubstanz ist von unzähligen, dicht nebeneinander gelagerten Körnchen, Vakuolen und Tröpfchen ausgefüllt. Je älter die Hyphen sind, desto stärker kommt diese Struktur zum Ausdruck und steigert sich so weit, daß das ganze Mycel bis in die jüngsten Ausläufer hinein punktiert erscheint. Mit gewöhnlicher Jodlösung färben sich die Hyphen rotbraun, doch nicht bis zum äußeren Rande, sondern es entsteht eine parallel zur Zellwand begrenzte Farbenfläche, in der die Körnchen selbst ungefärbt verbleiben. Diese tragen, nach der Reaktion mit Sudan 3 zu schließen, Fettcharakter.

Auch bei diesem Pilz kommt es zu einer deutlich ausgeprägten Gemmenbildung. Diese Dauerformen (Abb. 7) treten schon nach 4 bis 5 Tagen auf. Sie befinden sich vereinzelt in der Pilzdecke, nehmen aber an Zahl und Größe zu, so daß sie auch für diesen Schimmel typisch zu sein scheinen. Sie sind größtenteils endständig, mittelgroß und immer stark strukturiert. Sie lassen keine natürliche Färbung erkennen, sondern stimmen in dieser Hinsicht mit dem farblosen Pilzgewebe überein. Verdickungen in den Hyphen selbst konnten nur seltener beobachtet werden. Die vegetative Wachstumsform dieses Pilzes ist ebenso durch die körnige Inhaltssubstanz wie Kugelbildung gekennzeichnet, deren Anwesenheit wir beim Auftreten des Geruches ausnahmslos nachweisen konnten.

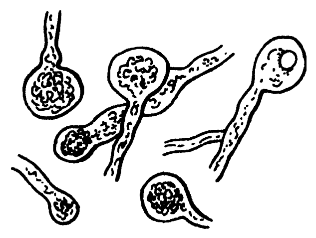


Abb. 7. Dauerzellen von *Scopulariopsis*. (1200 × vergr.)

Die Konidien sind unregelmäßig geformt, meistens oval mit mitunter verdicktem Rande. Bei genauerer Lichteinstellung kommt ihre unebene, leicht gezackte Oberfläche gut zum Ausdruck (Abb. 8). Ihre Größe schwankt zwischen (3 — 4) : (3 — 4) μ, mit allen dazwischenliegenden Werten.

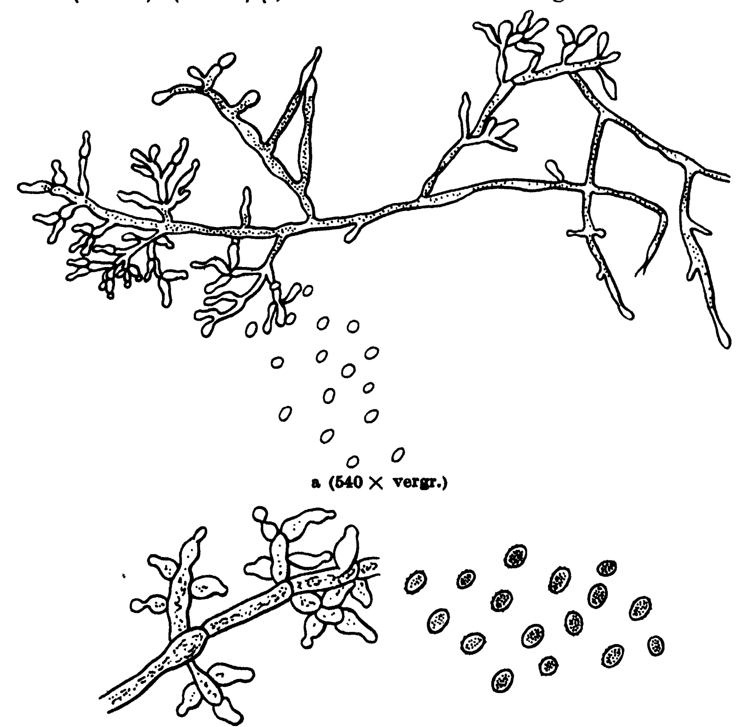


Abb. 8. Konidien und Fruchtstände von *Scopulariopsis*.

Sie sind stark strukturiert. Die ausgebildeten Fruchtstände der Pilzkultur (Abb. 8) zeigen sehr lange Hauptäste mit vielen, immer entgegengesetzt laufenden Seitenzweigen, die desto dichter werden, je näher man gegen das obere Ende des Hauptastes rückt.

Die Seitenzweige sind relativ kurz und zeigen an flaschenförmigen Sterigmen Absonderung einzelner Konidien. Wir konnten keine Pinselform der Fruchtstände feststellen, wohl aber gabelig verzweigte Arten, die sich nicht veränderten.

Der Riechstoff von *Scopulariopsis* weist in chemischer Hinsicht gegenüber den Riechsubstanzen der früher beschriebenen *Penicillium*-Arten grundlegende Unterschiede auf. Er destilliert aus der Pilzmasse mit Wasserdampf unverändert über und wird durch Säure- und Laugenzusatz nicht verändert. Die bei der Wasserdampfdestillation im Kolben verbleibende Pilzmasse war immer rein spinatgrün. Aus dem dickflüssigen, fetthaltigen, hellbraunen Ätherextrakt, der bei diesem Pilz relativ gering ist, geht der Riechstoff in kaltes Wasser über; die Lösung behält ihren Geruch auch beim Kochen, Bromwasser wird allmählich entfärbt, Natriumbisulfit vernichtet den Edelgeruch. Alkalische Silberlösung wird nicht reduziert. Diese Beobachtungen deuten auf die Gegenwart eines Ketons hin.

Zusammenfassung.

1. Wir untersuchten die Biologie von drei Schimmelpilzen mit Rücksicht auf die Ausbildung von Riechstoffen.

2. Der Geruch des *Penicillium expansum Link* ist fruchtartig nach Äpfeln, der Geruch der von einer Eichel erhaltenen *Penicillium*-Art ätherisch-harzig, kümmelartig, eine *Scopulariopsis*-Varietät besitzt den Edelgeruch des Roquefortkäses.

3. Das Auftreten des Riechstoffes ist bei den erstgenannten beiden Pilzen an die gleichzeitige Anwesenheit größerer Mengen von Gemmen und Konidien gebunden.

4. Die Riechstoffe wurden aus größeren Pilzmengen durch Wasserdampfdestillation bzw. Ätherextraktion isoliert und durch informative chemische Reaktionen gekennzeichnet.

5. Nach diesen darf man annehmen, daß die Riechstoffe von *Penicillium expansum Link* und der von einer Eichel erhaltenen *Penicillium*-Art Esternatur tragen, der Riechstoff von *Scopulariopsis* aber zu den Ketonen gehört.

Literatur.

1) *A. Janke*, Allgemeine technische Mikrobiologie, I. Teil, S. 215–217. Dresden und Leipzig 1924. — 2) *A. Janke* u. *H. Zikes*, Arbeitsmethoden der Mikrobiologie, S. 45–48. Dresden und Leipzig 1928. — 3a) *W. Henneberg*, Handbuch der Gärungsbakteriologie 2, 323–328, Berlin 1926; b) ebenda 1, 53, Berlin 1926; c) ebenda 1, 36–53, Berlin 1926. — 4a) *Ch. Thom*, The Penicillia, S. 64. Baltimore 1930; b) ebenda S. 595, Baltimore 1930; c) ebenda S. 512, Baltimore 1930.

(Aus dem Erbwissenschaftlichen Forschungsinstitut des Reichsgesundheitsamtes, Berlin-Dahlem.)

Über kernähnliche Strukturen bei Bacillus mycoides Flügge.

Von

Gerh. Piekarski, Berlin-Dahlem.

Mit 20 Textabbildungen.

(Eingegangen am 31. Oktober 1940.)

Eine der am häufigsten cytologisch untersuchten Bakterienarten ist *Bacillus mycoides Flügge*. Wiederholt wurde gerade mit diesem relativ großzelligen Bakterium versucht, die Frage zu beantworten, ob die vermutete Kernsubstanz bei Bakterien an einer bestimmten Stelle der Zelle lokalisiert oder im Plasma diffus verteilt ist. Aber trotz Verwendung der *Feulgen*schen Nuclealreaktion konnte diese Frage für *B. mycoides* bisher nicht befriedigend beantwortet werden. Es bestehen im wesentlichen drei verschiedene Auffassungen:

1. Die nuclealpositive Substanz bei diesen Bakterien ist diffus in der Zelle verteilt (*Pietschmann* und *Rippel* 1932, *Milovidov* 1935). Unter bestimmten Bedingungen tritt eine Entmischung der nuclealpositiven Substanz ein (*Pietschmann* und *Rippel*).

2. Die nuclealpositive, thymonucleinsäurehaltige Substanz ist in Form von kleinen Körpern vorhanden, die in bestimmter Zahl und Lage in jeder Zelle von *B. mycoides* zu finden sind (*B. Stille* 1937, *F. Neumann*, unveröffentlicht).

3. Die *Feulgen*-positive Substanz bei *B. mycoides* ist diffus verteilt, aber auch in Form von Körnchen lokalisiert und „erweckt eher den Eindruck eines Reservestoffes“ (*R. Schaede* 1939).

Pietschmann und *Rippel* untersuchten mit Hilfe der Nuclealreaktion, aber auch mit verschiedenen Farbstoffen u. a. eingehend *B. mycoides* und kamen zu dem Ergebnis, daß die *diffuse Verteilung* der nach *Feulgen* nachgewiesenen nuclealpositiven Substanz für die untersuchten Bakterien der „Normalzustand“ sei. Die Nuclealfärbung ist nach diesen Autoren an das Plasma und dessen Strukturbild gebunden. Durch Wachstum auf magnesium- oder lithiumhaltigen Nährböden läßt sich eine Entmischung der nuclealpositiven Substanz aus dem Plasma herbeiführen. „Beginnende Entmischung ist bei *B. mycoides* von Verlust der Vermehrungsfähigkeit begleitet. Eine spontane Entmischung wurde nicht beobachtet.“ Über die Bedeutung der nuclealpositiven Substanz für die Bakterienzelle äußern sich *Pietschmann* und *Rippel* dahingehend, daß sie unter Vorbehalt annehmen, in ihr „eine der Kernsubstanzen der übrigen Organismen entsprechende Substanz“ zu erblicken.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt *Milovidov* (1935) bei der Untersuchung des gleichen *Bacillus*. Er findet „in den jungen Stadien nur sehr schwache diffuse Nuclealreaktion, bei günstigen Bedingungen auch nucleale Einschlüsse". Leider gibt *Milovidov* nicht an, was er unter „günstigen Bedingungen" versteht. Nach *Milovidov* sammeln sich zu Beginn der Sporenbildung „die Nuclealstoffe in ein bis zwei Körnchen, die meist an den Polen liegen. In den Sporen findet man leicht ein gewöhnlich halbmondförmiges, chromatisches Körperchen mit guter Nuclealfärbung." Alle untersuchten Bakterienarten enthalten in keinem Stadium einen typischen Zellkern, wohl aber chromatische Körperchen oder einen diffus verteilten Nuclealstoff, die Thymonucleinsäure, einen Stoff, der „nur als Kernsubstanz bekannt ist".

Zwei Jahre später erschien eine Arbeit von *B. Stille*, die sich mit dem gleichen Gegenstand befaßte. Er untersuchte verschiedene sporenbildende *Bacillus*-Arten, insbesondere *B. mycoides*, und nahm an, die Ursache für die bis dahin beobachtete und beschriebene diffuse Nuclealfärbung gefunden zu haben. Er vertritt die Auffassung, daß die diffuse Anfärbung der gesamten Zelle als Kunstprodukt durch die Einwirkung der Hydrolyse bei einer Temperatur von 60° C herbeigeführt wird. „Hydrolysiert man bei niedrigerer Temperatur (40° C), so läßt sich die Diffusion der nuclealpositiven Substanz auf die gesamte Zelle aus ihrer ursprünglichen strukturellen Bindung verhindern." *B. Stille* und gleichzeitig, aber unabhängig, *Piekarski* an nicht-sporenbildenden Arten (1937, 1939), konnten zeigen, daß sporenbildende wie nicht-sporenbildende Bakterien in vegetativem Zustand auf frischen Nährböden zwei (oder ein Mehrfaches davon) nuclealpositive Körnchen enthalten, die gesetzmäßig in allen lebenden Bakterienzellen vorkommen und offenbar Teilungsvermögen besitzen. Wegen ihres kernähnlichen Verhaltens wurden sie von *Piekarski* als *„kernähnliche Strukturen"* oder *„Nucleoide"* bezeichnet. In einer anderen Arbeit ausführlicher dargelegte Überlegungen machen es wahrscheinlich, daß die Nucleoide die Kernäquivalente der Bakterienzelle sind (1939b).

Hier möchte ich eine leider bisher unveröffentlicht gebliebene Arbeit von *F. Neumann* erwähnen, die mir der Verfasser freundlicherweise zur Einsichtnahme überlassen hatte. *Neumann* publizierte schon 1930 eine Mitteilung über Befunde, die er mit der *Feulgen*schen Nuclealreaktion an Bakterien erhielt. Er kam damals zu dem Ergebnis, daß durch Teilungsvorgänge, Sporenbildung, Auftreten von Vakuolen und Reservestoffen die diffuse Verteilung der „Kernsubstanz" verändert werde. Sie verdichte sich zentral oder peripher zu stärkeren Granula, die den Eindruck von Kernen oder Chromosomen hervorrufen könnten. Ein morphologisch unterscheidbarer Kern ließ sich jedoch in keinem Falle nachweisen. — *F. Neumann* hat danach seine Untersuchungen in sehr eingehender Weise weitergeführt und kam schließlich in Abänderung seiner ersten Auffassung zu den gleichen Ergebnissen wie *Stille* und *Piekarski*. Er konnte mit der Nuclealfärbung wie auch u. a. mit Methylenblau und Giemsafärbung die gleichen kernähnlichen Strukturen darstellen.

Vor kurzem erschien nun eine Arbeit von *Schaede* (1939), in der verschiedene andere Beobachtungen zur Cytologie von *B. mycoides* und anderer Bakterienarten mitgeteilt werden. *Schaede* anerkennt darin zwar die Tatsache, daß nuclealpositive Körper in den Bakterien vorkommen, fand jedoch eine deutliche Abhängigkeit der Zahl dieser Körper vom Alter der Kultur und der Wachstumstemperatur. Er glaubt aber, daneben einen diffusen

Zustand nuclealpositiver Substanz annehmen zu müssen. Ferner konnte *Schaede* keine nuclealpositiven Körnchen *in* den Sporen feststellen, sondern kommt zu dem Ergebnis, daß „sie *außen* auf der Anlage der Sporen und nach deren Reife *außen* auf ihrer Membran sitzen". Auf Grund dieser verschiedenen Beobachtungen bezweifelt er letzten Endes überhaupt das Vorkommen einer echten chromatischen Substanz bei Bakterien und hält die nuclealpositive Substanz mehr für einen Reservestoff. „Es muß fraglich erscheinen, ob sie, falls sie wirklich Thymonucleinsäure oder ein nahe verwandter Körper ist, bei den Bakterien die Funktion der chromatischen Substanz besitzt." Wir kommen auf die Einwände von *Schaede* am Schluß der Arbeit nach Mitteilung der eigenen Befunde ausführlich zurück.

Die immer wieder auftretenden Behauptungen von dem Vorkommen diffus verteilter Kernsubstanz bzw. einer diffusen Nuclealfärbung als „Normalzustand" waren der Anlaß, noch einmal die schon so oft studierte Bakterienart *B. mycoides* eingehend zu untersuchen, um die sich widersprechenden Ergebnisse der verschiedenen Autoren richtig deuten und ein klares Bild über die cytologischen Verhältnisse bei *B. mycoides* gewinnen zu können.

Material und Methode.

Bei unseren Untersuchungen haben wir uns bewußt auf eine einzige Art, nämlich *Bacillus mycoides Flügge* beschränkt, aber drei verschiedene Stämme untersucht: *Stamm RK* (Robert Koch-Institut, Berlin), *Stamm Hy* (Hygienisches Institut der Universität, Berlin) und *Stamm Gö* (Institut für Mikrobiologie, Göttingen)[1].

Die Untersuchungen mit der Nuclealfärbung wurden ganz systematisch mit verschiedenen Fixierungsarten und Fixierungszeiten in Verbindung mit verschiedener Hydrolysedauer vorgenommen. Folgende Fixierungsmittel kamen zur Anwendung:

1. Methylalkohol. — 2. Abs. Äthylalkohol. — 3. Konz. wässerige Sublimatlösung, kalt. — 4. Konz. wässerige Sublimatlösung, warm. — 5. Sublimat-Alkohol, kalt. — 6. Sublimat-Alkohol, warm. — 7. Sublimat-Alkohol + Eisessig. — 8. Osmium-Dampf, $^1/_2$—2 Minuten. — 9. Formalindampf und 10% Formol. — 10. Chrom-Osmiumsäure. — 11. Essigsäure.

Die Einwirkungsdauer der flüssigen Fixierungsmittel war in der Regel 15 bis 20 Minuten; danach kamen die Präparate über 80 und 50% Alkohol (je 24 Stunden) in destilliertes Wasser. Für die *Feulgen*sche Nuclealfärbung bewährten sich am besten die Sublimatgemische bei 20 Minuten Einwirkungsdauer. Auch *ohne* Fixierung wurden die gleichen, immer sehr guten Präparate erhalten. Schlechte Strukturbilder ergab Fixierung mit Methylalkohol, Formalin und Chromsäure.

[1] Den Herren Vizepräsident Prof. Dr. *Gildemeister*, Institut Robert Koch, Berlin, Prof. Dr. *Habs*, Hyg. Inst. der Universität, Berlin und Prof. Dr. *Rippel*, Inst. f. Mikrobiologie, Göttingen, danke ich bestens für die Überlassung der *mycoides*-Stämme.

Zur *Feulgen*-Reaktion wurden die Präparate 8 bis 10 Minuten (Sporenmaterial auch 25 bis 35 Minuten) bei 58 bis 60° C in normaler Salzsäure hydrolysiert und nach kurzem Abspülen in destilliertem Wasser mindestens $1^1/_2$ Stunde in fuchsinschwefliger Säure gefärbt (Sporen sogar bis 24 Stunden), dann nach kurzem Aufenthalt in SO_2-haltigem Wasser (10 Min.) in schnellfließendem Leitungswasser gespült. Vergleichende Prüfungen ergaben, daß eine Pseudofärbung bei derartiger Behandlung vollständig ausblieb, während allein in SO_2-haltigem Wasser das Plasma durchaus nicht immer ganz farblos blieb. Hier liegt meines Erachtens eine der Fehlerquellen bei der Anwendung der Nuclealreaktion bei Bakterien, die leicht zu Mißdeutungen und Täuschungen führen kann. Zur Plasmagegenfärbung wurde Alizarinviridin in alkoholischer Lösung benutzt.

Die Präparationstechnik war im übrigen die gleiche, wie schon früher beschrieben. Die Bakterien wurden vom Nährboden auf die Deckgläser mit einem Tropfen physiologischer Kochsalzlösung oder sterilen Leitungswassers gebracht und sofort nach Verdunstung der Flüssigkeit fixiert. Die von *Schaede* empfohlene Verwendung von Eiweiß zur Präparation brachte keine Verbesserung der mikroskopischen Bilder. Eine völlige Austrocknung der Bakterien vor der Fixierung wurde vermieden. —

Die Färbungen mit Farbstoffen (Giemsa, Carminessigsäure*) wurden ebenfalls wie bei den ersten Untersuchungen vorgenommen (*Piekarski*, 1937).

Werden die nuclealgefärbten Präparate in Kanadabalsam über Xylol eingebettet, so macht ihre Betrachtung wegen der starken Aufhellung große Mühe, vor allem dann, wenn eine Gegenfärbung unterbleibt. Dennoch sind wir nach vergleichenden Prüfungen bei dieser Methodik geblieben, weil sie die sichersten Ergebnisse zeitigt. Es muß bei dieser Technik nur darauf geachtet werden, die Bakterien wie Sporen nicht zu schnell durch die Alkoholreihe zu führen (je Stufe mindestens 20 Minuten). Sonst wird die Entwässerung ungenügend, und es können durch Luft oder Wasser im mikroskopischen Bilde Kunstprodukte entstehen, die falsche Schlüsse über die Lagerung der Zellinhaltskörper herbeiführen.

Die notwendigen Kontrollen (Plasmalogenreaktion und Färbung ohne Hydrolyse) wurden stets berücksichtigt, blieben aber immer negativ. Die

* Zur Verwendung der Carminessigsäure sei bemerkt, daß die käufliche C. E. S. nicht für diese cytologischen Zwecke zu verwenden ist. Man stellt sie sich am besten folgendermaßen selbst her: 100 ccm Eisessig + 100 ccm Aqua dest. + 3 g Carmin werden auf dem Wasserbad oder auch mit kleiner Flamme direkt solange gekocht, bis die Lösung auf die Hälfte ihres Volumens eingedampft ist. Danach kalt filtrieren. Die Farblösung ist dann gebrauchsfertig. Sie muß schon in dünner Schicht (Reagensglas) einen tief-dunkelroten Farbton haben. (Vor kurzem erschien auch ein Bändchen von *L. Geitler*, Verlag Borntraeger, 1940, in dem auch Rezepte zur Herstellung von C. E. S. mitgeteilt werden.)

Bakterien wurden auf gewöhnlichem Bouillonagar und auf dem auch von *Schaede* benutzten Nährboden (1,5 % Agar, 1 % Pepton, 5 % Liebigs Fleischextrakt, 0,5 % Kochsalz, 0,5 % Traubenzucker, $p_H = 7,0$) gehalten. Die Art des verwendeten Nährbodens hatte auf die Untersuchungsergebnisse keinen Einfluß.

Die Beimpfung der Petrischalen erfolgte stets nur in der Mitte der Platte. Die Bakterien wuchsen dann konzentrisch um die Impfstelle, und mit fortschreitendem Wachstum konnten die verschiedenen Zonen der beim Schluß des Wachstums die ganze Platte bedeckenden Kolonie durch Entnahme des Bakterienmaterials mit einer Platinöse in einem Tropfen Wasser auf ihren Zustand geprüft werden. In dieser Art wurden dann von Platte zu Platte alle 2 Tage Passagen angelegt, bei 30° im Brutschrank gehalten und laufend untersucht. Direkte Beobachtungen an ungefärbtem Zellmaterial wurden häufig auch auf den Kulturplatten (Petrischalen), im größeren Umfange aber an Deckglaskulturen vorgenommen. Besonders die Deckglasmethode nach *Fortner* und *Hu* erlaubte eingehende Untersuchungen einzelner Zellen und die Verfolgung des Verhaltens einzelner Zellen innerhalb langer „Zellfäden" in bezug auf Wachstum und Sporenbildung unter Verwendung stärkster Objektive. Gerade diese Untersuchungsmethode ergab ganz wesentliche Aufschlüsse über die Zusammenhänge zwischen den einzelnen Zellformen.

Bei den vergleichenden Untersuchungen wurde peinlichst darauf geachtet, gleichaltriges Material von gleicher Kulturplatte und Koloniestelle zu prüfen. Vielfach wurde so vorgegangen, daß zunächst die Zellen auf der Kulturplatte betrachtet, dann (möglichst von der gleichen Stelle) etwas von den Bakterien auf einen Objektträger gebracht und in Wasser ungefärbt untersucht, schließlich während der Beobachtung seitlich etwas Farblösung unter das Deckglas zugetropft wurde. Daneben wurde dann gleichartiges Material auf frischen Nährboden (Deckglaskultur!) geimpft und die Lebensfähigkeit der einzelnen Keime geprüft. So ließ sich mit einiger Sicherheit feststellen, welche Zellformen lebensfähig und zur Bildung einer Spore befähigt und welche Bakterien nicht mehr als normal und als im Absterben begriffen anzusehen sind.

Alle Abbildungen stellen Mikrophotographien von *Bacillus mycoides*, Stamm *RK* dar, aufgenommen mit Miflex-Kamera (Zeiss), Okular 12 ×, Objektiv 90 ×, Vergrößerung 1080 ×.

Untersuchung ungefärbter Bakterien.

Will man bestimmte Elemente einer Zelle — gleich, ob Zellen eines Gewebes oder einzelne Bakterien — untersuchen, so ist erste Voraussetzung, daß die Möglichkeit einer Täuschung durch sekundäre Veränderungen, durch Degenerations- und Absterbeerscheinungen und damit u. U. verbundene autolytische Prozesse in der Zelle, ausgeschlossen

wird. Man muß sich darüber Gewißheit verschaffen, daß die untersuchten Zellen auch noch zum Zeitpunkt der Präparation lebens- und vermehrungsfähig waren. Naturgemäß werden in der Regel durch Fixierungs- und Färbemittel *abgetötete* Formen untersucht, aber es muß unbedingt vermieden werden, *abgestorbene* Zellen bei der Deutung und Bewertung bestimmter Zellelemente zugrunde zu legen. Nur Primärstrukturen und keine Kunstprodukte dürfen bei der Deutung von Zellinhaltskörpern gefärbter Präparate als Unterlage dienen. Diese Forderung erscheint zwar selbstverständlich; wie aber neuere Publikationen gezeigt haben, ist diese Forderung allem Anschein nach nicht immer bei cytologischen Untersuchungen erfüllt worden. Es wurde deshalb bei unseren Untersuchungen, wie schon früher, die Deckglaskulturmethode verwendet, weil sie allein es erlaubt, die Struktur der einzelnen unfixierten, ungefärbten Bakterien bei stärkster Vergrößerung zu betrachten und zugleich mit großer Sicherheit zu entscheiden, ob die Zellen noch lebens- und vermehrungsfähig oder abgestorben sind. Es sind auf diese Weise eine große Anzahl von einzelnen Bakterien der drei oben genannten *mycoides*-Stämme untersucht worden.



Abb. 1. Freie Sporen am Deckglas in Bouillon, ungefärbt.



Abb. 2. Das gleiche Material wie Abb. 1, gleiche Präparatstelle nach 1 Std. Aufenthalt in Bouillon, zum Teil gequollene Sporen, ungefärbt.



Abb. 3. Freie Sporen auf Deckglaskultur, ungefärbt, verschieden stark gequollen.

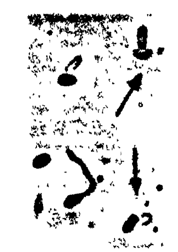


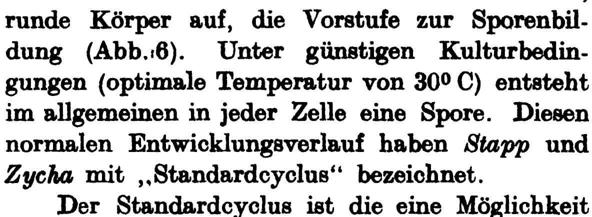
Abb. 4. Gleiche Präparatstelle wie Abb. 3, etwa $2^1/_2$ Std. später 2 Sporen sind gekeimt (Pfeil!), ungefärbt.

Bei der Beschreibung der ungefärbten Zellen kann ich mich kurz fassen und auf die ausführliche Arbeit von *Stapp* und *Zycha* (1931) verweisen, die die gleichen Beobachtungen machen konnten wie wir. Werden Sporen auf frischen Nährboden geimpft, dann beginnen sie zum Teil schon nach etwa einer halben Stunde zu quellen und nach etwa 2 Stunden keimen die ersten (Abb. 1 bis 4). Das zuerst kurze Stäbchen streckt sich und teilt sich schließlich. Diese wachsenden Zellen lassen im Hellfeld fast keinerlei Innenstruktur erkennen (Abb. 5).



Abb. 5. Frisch gekeimte, wachsende, vegetative Bakterien auf Deckglaskultur, unfixiert und ungefärbt.

Sie sind fast ohne jede bestimmte Struktur und erscheinen homogen grauweiß. Dieses Aussehen behalten sie bis zur Sporenbildung bei. Nach einer gewissen Zeit hört das Wachstum auf; nur die außen am freien Rande der Kolonie liegenden Zellen wachsen in der Regel weiter, bis der Nährboden erschöpft ist, bzw. angehäufte Stoffwechselprodukte das Wachstum hemmen. Es treten dann in den Zellen stärker lichtbrechende, runde Körper auf, die Vorstufe zur Sporenbildung (Abb. 6). Unter günstigen Kulturbedingungen (optimale Temperatur von 30° C) entsteht im allgemeinen in jeder Zelle eine Spore. Diesen normalen Entwicklungsverlauf haben *Stapp* und *Zycha* mit „Standardcyclus" bezeichnet.



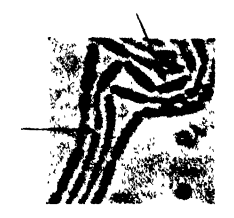


Abb. 6. Vegetative Zellen bei der Sporenbildung. Sporenanlagen, Pfeil! Lebendes Material auf Deckglaskultur, ungefärbt.

Der Standardcyclus ist die eine Möglichkeit der Entwicklung. Die zweite Möglichkeit besteht in der vegetativen Vermehrung *ohne* schließliche Sporenbildung. In diesem Falle gehen die Bakterien nach einer Reihe von Teilungen zugrunde. Sie zeichnen sich dann im ungefärbten Zustand durch ihre reiche, aber dabei ganz unregelmäßige Innenstruktur aus und sind nach einiger Übung von den homogen erscheinenden, lebensfähigen vegetativen Zellen und von Bakterien mit Sporenanlagen leicht zu unterscheiden (vgl. Abb. 7 bis 10).

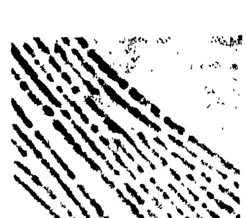
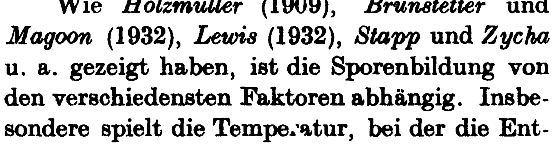


Abb. 7. Abgestorbene Bakterien auf Deckglaskultur. Unregelmäßige Innenstruktur, ungefärbt.



Wie *Holzmüller* (1909), *Brunstetter* und *Magoon* (1932), *Lewis* (1932), *Stapp* und *Zycha* u. a. gezeigt haben, ist die Sporenbildung von den verschiedensten Faktoren abhängig. Insbesondere spielt die Temperatur, bei der die Entwicklung erfolgt, eine große Rolle. Bei 30° C werden die meisten Sporen gebildet, bei Zimmertemperatur ist die Sporulation gering, bei Temperaturen von 36 bis 40° C bleibt sie bei den meisten Stämmen schließlich ganz aus.

Die drei *mycoides*-Stämme verhielten sich in bezug auf Entwicklung und Sporenbildung nicht gleichartig. Es würde zu weit führen und den Rahmen dieser Arbeit weit überschreiten, wenn wir alle Einzelheiten mitteilen wollten, die wir im Zusammenhang mit der Sporenbildung beobachtet haben. Nur einige diesbezügliche Hinweise sollen hier gegeben werden, weil sie bei den cytologischen Untersuchungen Berücksichtigung verdienen.

Stamm RK: Der anfangs gut sporenbildende, rechtsdrehende Stamm verliert mit zunehmender Passagenzahl (vgl. S. 410) sein Sporenbildungsvermögen. Nach 5 Passagen (d. s. 10 Tage bei 30° C) fanden wir in einem Falle keine einzige Spore mehr auf der Kulturplatte. Bei Zimmertempe-

ratur kultiviert zeigt der Stamm das gleiche Verhalten, nur mit dem Unterschied, daß die Sporenbildung später ausbleibt. Die Masse der Bakterien geht zugrunde und unter vielen tausend Keimen wachsen nur vereinzelte wieder auf frischem Agar weiter. Diese unterscheiden sich in ungefärbtem Zustande von den abgestorbenen durch die fehlenden Zellinhaltskörper („Dauerzellen" nach *Lewis*). Doch wachsen wiederum nicht alle von ihnen mehr weiter. Diese homogenen Zellen wirken hier in gewissem Grade — ähnlich wie Sporen — arterhaltend, sie haben aber sonst nicht die Widerstandsfähigkeit der Sporen gegenüber extremen Außenbedingungen. Welche Umstände einzelne Zellen am Leben erhalten und so den völligen Tod der Kultur verzögern, ist unklar. Ebenso wenig konnte das Abnehmen des Sporenbildungsvermögens geklärt werden. Anscheinend spielen hierbei die Nährbodenverhältnisse eine Rolle.

Stamm Hy: Der linksdrehende *Hy-Stamm* wächst anfangs in typischer R-Form. In der Mitte der Kolonie und der mittleren Wachstumszone haben fast alle Zellen schon nach 2 Tagen in jeder Passage (bei 30° C) Sporen gebildet. Nach 4 Tagen treten dann im Abstand von $^1/_2$ bis 1 cm von dem wachsenden freien Kolonierand einzelne kleine runde sekundäre Kolonien auf, die rings um die ganze primäre Kolonie verteilt und aus anfangs homogen erscheinenden Bakterien zusammengesetzt sind, die häufig noch ein oder mehrere große, mit Sudan III färbbare Vakuolen besitzen, also offenbar Fett enthalten. Diese Bakterien degenerieren aber bald und sterben ab. (Vgl. die gleichen Beobachtungen bei *Lewis*; seine Abb. 24.)

Stamm Gö: Der Göttinger *mycoides*-Stamm neigt sehr zur Bildung von Fettvakuolen. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von *Pietschmann* und *Rippel* habe ich aber in wachsenden, also sicher lebensfähigen Bakterien dieses Stammes niemals „tanzende Fettröpfchen", die (nach diesen Autoren) eventuell Schlüsse auf die Konsistenz des Plasmas zulassen, finden können. In abgestorbenen Zellen dagegen sind offenbar durch Molekularbewegung sich bewegende Fetttröpfchen zu beobachten. Die Fettvakuolen in den lebenden Zellen werden oft so groß, daß ihr Durchmesser gleich der Breite des Bakteriums ist. Die Sporenbildung ist zu Beginn der Kultivierung sehr reichlich, sie nimmt aber mit zunehmender Passagenzahl auf unserem Nährboden ab, jedoch nie so stark wie bei dem *Stamm RK*. Es treten auch bei diesem Stamm mit rückgehender Sporulation mehr und mehr degenerierende Zellen auf, die schließlich absterben. Häufig beginnt der Stamm am 5. bis 6. Kulturtage „glatt" zu wachsen. In dieser „glatten" Zone sind wiederum nur absterbende Zellen zu finden.

Zusammenfassend läßt sich also über die Struktur, das Wachstum und die Entwicklung der *mycoides*-Kolonien feststellen, daß bei der cytologischen Untersuchung dieser Bakterien und der Deutung be-

stimmter Zellelemente mit zwei Entwicklungsmöglichkeiten gerechnet werden muß: 1. Spore — vegetative Vermehrung — Sporenbildung; 2. Spore — vegetative Vermehrung — Degeneration — Tod.

In der Abb. 9 (Mitte) ist die Stelle einer Deckglaskultur wiedergegeben, an der Bakterien liegen, die sich im Zustande der beginnenden Degeneration befinden, daneben aber liegen zwei mehrgliedrige Zellreihen, die abgestorben und bei der Beimpfung des Nährbodens mitgeschleppt und ohne zu wachsen liegen geblieben sind.



Abb. 8. Bakterien, teils mit fertigen Sporen, teils degenerierte, abgestorbene, „leere" Zellen, Deckglaskultur, ungefärbt.



Abb. 9. Beginnende Degeneration der Bakterien, daneben 2 abgestorbene, schon bei der Beimpfung der Deckglaskultur mitgeschleppte Bakterien„fäden" (Pfeile!), ungefärbt.



Abb. 10. Abgestorbene Bakterien„fäden" mit dazwischen liegenden gesunden vegetativen Formen, ungefärbt. (Deckglaskultur!)

Bemerkenswert ist ferner, daß manchmal ganze Zellfäden bis auf ein einzelnes, anscheinend auch wieder resistenteres Bakterium zugrunde gehen. Dann entsteht ein Bild, wie es in Abb. 10 wiedergegeben ist: lange abgestorbene Fäden mit einem dazwischenliegenden gesunden Bakterium (vgl. auch *Stapp* und *Zycha*, S. 510 ff.). Die absterbenden Zellen sind in der Regel mit Inhaltskörpern erfüllt, die gelegentlich starke Molekularbewegung zeigen. Mehrere Tage alte tote Zellen werden schließlich optisch leer (Abb. 8).

Die Behauptung, daß die sogenannten degenerierten Zellen abgestorbene Bakterien sind, stützt sich auf eine sehr große Zahl von Einzell-Beobachtungen. Die Deckglaskulturmethode erlaubt in bequemer Weise — besser als die Isolierung einzelner Keime mit dem Mikromanipulator — die Kontrolle einer großen Zahl von einzelnen Bakterien auf Lebensfähigkeit.

Die gleichen Beobachtungen wurden übrigens auch von anderen Autoren gemacht. Hier sei nur auf folgende Angaben verwiesen:

Stapp und *Zycha* berichten, daß von 45 als „normal" angesprochenen und einzeln isolierten Zellen 34 anwuchsen. Von 50 isolierten „Kümmer"- und „Fett"-Stäbchen verschiedener Stämme von *B. mycoides* konnte kein einziges zur weiteren Entwicklung gebracht werden. Die gleiche Beobachtung wurde an älteren Bouillonkulturen gemacht. Zeigte die Gram-Färbung oder das Dunkelfeld keine „normalen" Stäbchen mehr, so erhielten die Autoren selbst bei Überimpfung größerer Bakterienmengen auf frischen

Nährboden kein Wachstum mehr. Von 37 Kulturen, die 10 bis 15 Wochen in Dextrosebouillon gehalten wurden, konnten nach dieser Zeit nur noch 23 auf frischen Nährböden zum Anwachsen gebracht werden. *Stapp* und *Zycha* kommen daher zu dem Schluß, „daß die von der ‚normalen‘ Form deutlich abweichenden Bakterienzellen nicht mehr vermehrungsfähig sind und daher als ‚Degenerationsformen‘ angesprochen werden müssen“.

Auch *Pietschmann* und *Rippel* stellten bei ihren Isolierungen von *B. mycoides* mit dem Mikromanipulator fest, daß bei den Kontrollen (ohne Lithiumsulfat) im Durchschnitt nur 58,2% der isolierten Bakterien anwuchsen:

Nr.	Zahl der isolierten Bakterien	Alter der Kultur	Gewachsen
1	6	1 Tag	6
5	6	1 „	2
2	6	2 Tage	4
3	6	5 „	2
4	7	10 „	4
	31		18 = 58,06%

(Die Tabelle enthält nur einen Teil der von den Autoren angegebenen Kontrollen.)

Wie die Autoren betonen, wurden zu den Kontrollen auch sehr vakuolenreiche Zellen ausgesucht, die — wie *Pietschmann* und *Rippel* angeben — „äußerlich überaltet aussahen“. — Diese Ergebnisse zeigen, daß durchaus nicht jede Bakterienzelle einer *Mycoides*-Kultur lebensfähig ist. Zu den Zellisolierungen von *Pietschmann* und *Rippel* sei bemerkt, daß das Alter einer Kultur nicht so bedeutsam ist, sondern die *Stelle* der Kolonie, von der die Bakterien entnommen werden. Isoliert man die Bakterien vom noch *frei wachsenden Rand* einer selbst 10 Tage alten Kolonie (bei 30° C), dann kann man u. U. noch jede Zelle zur Vermehrung bringen. —

Schließlich sei auf die Arbeit von *L. E. den Dooren de Jong* hingewiesen, der bei seinen Studien über *B. mycoides* und den Pleomorphismus Stämme dieser Bakterienart fand, bei denen „sporenlose Mutilate“ (*J. J. van Loghem*) — d. s. Stämme, die ihr Sporenbildungsvermögen verloren haben — auftraten. Er fand ebenfalls verschiedene Zelltypen: schlanke, strukturlose Stäbchen und dünne, bisweilen stark gekörnte Zellen.

Untersuchung der gefärbten Bakterien.

Da das Ziel der Untersuchungen darin bestand, festzustellen, wo und in welcher Form die zu erwartende Kernsubstanz in den Bakterien zu finden ist, wurde in erster Linie die *Feulgen*sche Nuclealreaktion und Carminessigsäure benutzt, daneben Methylenblau, Giemsa- und andere Farblösungen.

Entnimmt man wahl- und kritiklos einer etwa 2 Tage alten, kreuz und quer beimpften Platten- oder Schrägagarkultur etwas Bakterienmaterial mit einer Platinöse, dann kann man nach Färbung mit der *Feulgen*schen Nuclealreaktion je nach der Entwicklungsform des Stammes (vgl. oben S. 414) und je nach der Stelle, der das Material entnommen worden ist, ganz unterschiedliche Strukturbilder finden. Bei

der Beschreibung einzelner Stellen solcher Präparate können dann aber —, wie die Beobachtungen an den ungefärbten Zellen gezeigt haben — allgemeine Angaben über das Alter der Kulturplatte keinen Sinn haben. Deshalb ist es wenigstens für *B. mycoides* unerläßlich, bei cytologischen Studien übersichtlich wachsende Kolonien zu untersuchen und nacheinander die verschiedenen Wachstumszonen nach mehreren Methoden vergleichend zu prüfen. Dann ergibt sich folgendes Bild:

Die Bakterien am äußersten Rand einer konzentrisch bei 30° C wachsenden Kultur (24 Stunden bis 6 Tage alt), die ungefärbt homogen, strukturlos aussehen, lassen nach der *Feulgen*schen Nuclealreaktion in jeder Zelle zwei — bei längeren Fäden ein Mehrfaches davon — *Feulgen*-positive Körper erkennen (Abb. 11), die in ganz der gleichen Weise wie von mir bei *B. paratyphi*, *coli*, *pyocyaneum*, *proteus*, *prodigiosum* u. a., von *B. Stille* bei *B. mycoides*, *mesentericus fuscus*, *megaterium*, *subtilis* u. a. und von *R. Schaede* (vgl. den oberen Bakterienfaden seiner Abb. 2) bei *B. mycoides* in vakuolenfreien Formen beobachtet ist, wiedergegeben sind. Sie sind zweifellos mit den sogenannten Nucleoiden identisch.



Abb. 11. Normale vegetative Zellen mit typischer Zahl und Anordnung der Nucleoide (vgl. Abb. 5). Nach *Feulgen* gefärbt.

Die Giemsa-Färbung bestätigt den Befund der Nuclealreaktion, wenn man nach kräftiger Färbung mit 1%iger Eosinlösung differenziert (Methode *Badian*; *B.*'s Deutungen sind sicher abwegig). Die Carminessigsäure färbt bei diesen Formen nur die Zellhülle. Innenstrukturen sind nicht zu erkennen. Impft man diese Bakterien auf frischen Nährboden, dann wachsen sie in jedem Falle weiter. Das gilt für alle drei Stämme: *RK*, *Hy* und *Gö*.

Betrachtet man die Zellen einer etwa 2 Tage alten, konzentrisch gewachsenen Kultur, die etwa 1 cm vom makroskopisch sichtbaren Kolonierand liegen, dann findet man je nach der Entwicklungsart des Stammes entweder degenerierte oder sporenbildende Bakterien. Werden die degenerierenden und degenerierten Formen, die ungefärbt große und kleine Inhaltskörper erkennen lassen, nach *Feulgen* gefärbt und über die Alkoholreihe in Kanadabalsam eingebettet, dann findet man wiederum die *Feulgen*-positiven Körper, aber häufig nicht mehr in typischer Anordnung und Form, sondern durch die zahlreichen, oft sehr großen Vakuolen aus ihrer normalen Lage gedrängt, dicht an diesen gelegen und dann meist schwer zu erkennen. Die Vakuolen enthalten allem Anschein nach Öl oder Fette; denn mit Sudan III färben sie sich orange an und erscheinen nach Alkoholbehandlung leer. Mit wässerigem Methylenblau lassen sie sich im Gegensatz zum übrigen Zellkörper

nicht färben und heben sich als stark lichtbrechende Einschlüsse von der blauen Zelle deutlich ab. Carminessigsäure färbt wiederum nur die Bakterienhülle. Interessant ist dabei, daß die Vakuolen dann nur ganz schwach als wenig heller rote Höfe in der Zelle zu sehen sind. Nach allen meinen Beobachtungen können die auch nur wenig vakuolisierten Bakterien nicht mehr voll lebensfähig sein; denn ich habe nur selten sich teilende und vermehrende Formen mit Vakuolen gefunden. Auch nach Übertragung auf frischen Nährboden wuchsen diese Zellen zum größten Teil nicht mehr weiter.

Prüft man auf der oben genannten 2 Tage alten Kultur die degenerierten Zellen, die näher zum Zentrum der Kolonie, also schon etwa



Abb. 12. Zum größten Teil abgestorbene Bakterien, mit Carminessigsäure gefärbt. Homogen gefärbte „normale" Zellen bei *a*; *b* = „leere" abgestorbene Zelle. Die meisten Bakterien enthalten die (auch nuclealpositiven) oft unregelmäßigen, sekundär veränderten Zelleinschlüsse.



Abb. 13. Abgestorbene, degenerierte Formen, mit Carminessigsäure gefärbt (vgl. Abb. 12).

24 Stunden auf der Kulturplatte liegen, dann findet man *Feulgen*-positive Strukturen in mannigfaltiger Ausbildung. Sie sind meist nicht mehr in typischer Zweizahl und normaler Form vorhanden, sondern fehlen in manchen Bakterien; einige haben nur *einen* auffallend kleinen Körper, andere enthalten mehrere in unregelmäßiger Größe, wieder andere sind länglich, tropfenförmig. Nur ganz wenige Bakterien kann man finden, die zwei oder vier typisch gelagerte nuclealpositive Körper enthalten. Eigenartig ist nun dabei, daß diese im Innern unregelmäßig strukturierten Bakterien zum größten Teil mit Carminessigsäure das gleiche cytologische Bild ergeben wie nach der Nuclealfärbung (Abb. 12 und 13). Die fortschreitende Degeneration lockert offenbar die Bakterienhülle derart, daß sie für die Carminessigsäure durchlässig wird. Angenehm ist dabei, daß im Gegensatz zu den Nuclealpräparaten bei der

Färbung mit Carminessigsäure — wie schon erwähnt — eventuell vorhandene Vakuolen fast gar nicht zu sehen sind und sich so bei der Beobachtung nicht störend bemerkbar machen können. Einige wenige Bakterien wiederum färben sich mit Carminessigsäure nur gleichmäßig diffus an; und diese sind die gleichen, die im ungefärbten Zustand auch keine Zellinhaltskörper erkennen lassen und — wie die Bakterien am äußersten freien Kolonierand — homogen, strukturlos sind. Die Abb. 12 zeigt diese verschiedenen Formen nebeneinander *a* ist eine „normale", diffus rot gefärbte, *b* ist dagegen eine abgestorbene, schon ganz leere Zelle. In den meisten anderen Bakterien sind die verschieden gestalteten, auch *Feulgen*-positiven Strukturen zu erkennen; sie sind Formen, die mit Sicherheit nicht mehr lebensfähig, sondern abgestorben sind, in denen nur als widerstandsfähiger Rest die jetzt allerdings sekundär veränderten kernähnlichen Strukturen zu finden sind.

Bei der Entwicklung zur Spore ändert sich die Zahl der nuclealpositiven Strukturen zunächst nicht. Es entsteht aber an einem Ende des Bakteriums ein etwas hellerer, stärker lichtbrechender Hof, der einen *Feulgen*-positiven Körper umschließt. Mit Carminessigsäure färbt sich auf diesem Stadium der Sporenbildung wiederum nur die Bakterienhülle. Ist schließlich die Spore reif, aber noch in der Sporenmutterzelle, dann findet man in den Nuclealpräparaten Sporen, bei denen man den ganz deutlichen Eindruck gewinnt, daß ein nuclealgefärbter Körper häufig *außen* an der Spore haftet, während das Innere der Spore leer bleibt. So kommt man leicht zu dem Schluß, die Spore sei ohne *Feulgen*-positive Substanz, wie z. B. auch von *Schaede* (1939) behauptet wird. In Wirklichkeit läßt sich der Nuclealkörper *in* der Spore auf gewissen Stadien nur mit der gewöhnlichen Technik der Nuclealfärbung nicht darstellen. Während nämlich die nuclealpositiven Körper in den vegetativen Zellen nach einer Hydrolyse von 10 Minuten zur Darstellung kommen, müssen die Sporen *25 bis 35 Minuten der 60° C-Hydrolyse* ausgesetzt werden. Erst innerhalb dieses Zeitraumes ist die Salzsäure durch die feste Hülle ins Innere der Spore vorgedrungen. Entsprechend muß auch die Einwirkungsdauer der fuchsinschwefligen Säure verlängert und bis auf 15 bis 24 Stunden ausgedehnt werden. Dann aber ist in den meisten Sporen deutlich ein nuclealpositiver Körper zu sehen (vgl. Abb. 14 und 15).

Der Nachweis, daß jede reife, keimfähige Spore einen Nuclealkörper in ihrem Innern trägt, läßt sich sehr leicht auch auf folgende Weise führen:

Man beimpft eine frische Agarplatte mit möglichst freien Sporen und macht nach etwa einer halben bis einer Stunde (bei etwa 25 bis 30° C Deckglas-Klatschpräparate. Nach diesem Zeitraum sind die Spore)

noch nicht gekeimt, aber sie haben eine gewisse Quellung erfahren Wie man auf Deckglaskulturen beobachten kann, verlieren die Sporen dabei ihr starkes Lichtbrechungsvermögen, das dann kaum noch größer

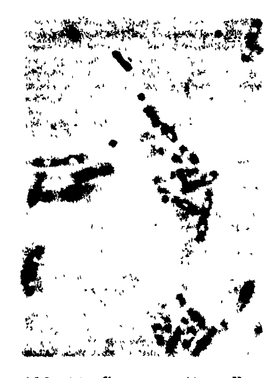


Abb. 14. Sporenmutterzellen mit Sporen nach Nuclealreaktion mit 10 Min. Hydrolysedauer. „Leere" Sporen, z. T. *neben* der Spore in der Zelle ein Nuclealkörper.



Abb. 15. Sporenmutterzellen (gleiches Material wie in Abb. 14) nach Nuclealreaktion mit 35 Min. Hydrolysedauer. Sporen mit je einem kernähnlichen Körper.

ist, als das einer vegetativen Zelle (Abb. 1 bis 4). In gewöhnlichem Leitungswasser tritt diese Quellung nicht ein (vgl. auch *Holzmüller* 1909). Unterwirft man diese leicht gequollenen Sporen der Nuclealreaktion, so findet man inmitten jeder Spore einen nuclealpositiven

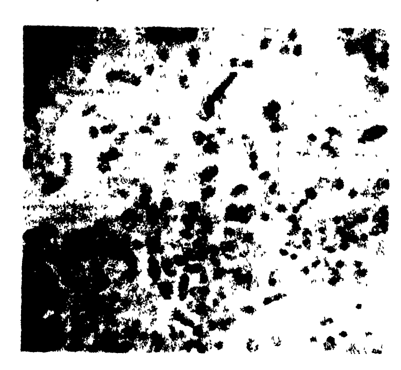


Abb. 16. Freie Sporen nach Färbung durch Nuclealreaktion. Hydrolysedauer: 10 Min. Exzentrisch, zum Teil scheinbar fast außerhalb gelegene Nuclealkörper.

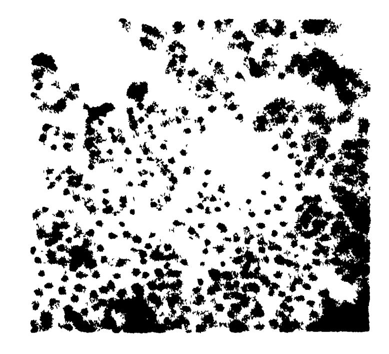


Abb. 17. Freie Sporen, gleiches Material wie in Abb. 14 nach 1/2 stündigem Aufenthalt auf frischem Nährboden (Agarbouillon). Die leicht gequollenen Sporen nach *Feulgen* gefärbt (vgl. Abb. 2 und 3).

Körper (Abb. 16 bis 18). Der vorher (Abb. 16) exzentrisch gelegene, manchmal *scheinbar außen* an der Spore haftende Nuclealkörper liegt nun *mitten in der Spore*. Schon nach kurzer Zeit nimmt der Körper Hantelform an und — wie man auch hier aus den Abbildungen schließen

darf — teilt sich, so daß die Sporen kurz vor der Keimung schon zwei *Feulgen*-positive Körper enthalten. Die Sporen sind dann auch nicht mehr rund, wie zur Zeit der beginnenden Quellung, sondern länglich, fast einem kurzen sehr gedrungenen Stäbchen gleich. Das nach etwa 2 bis $2^1/_2$ Stunden aus der Spore „schlüpfende" Bakterium enthält daher schon zwei Nuclealkörper (Abb. 4 und 19).



Abb. 18. Freie Sporen, gleiches Material wie in Abb. 16 und 17, nach 1 stündigem Aufenthalt auf frischem Nährboden. Nuclealreaktion! Teilungsformen in den Sporen. Pfeil!

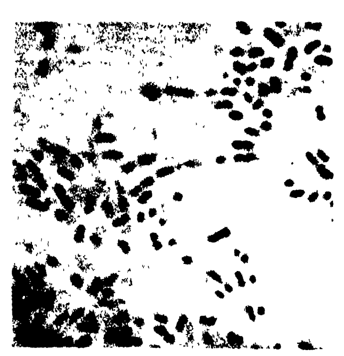


Abb. 19. Die gekeimten Bakterien, meist kurze Stäbchen mit je zwei Nucleoiden (vgl. Abb. 4) und Sporen.

Diese Quellung der Sporen, die also keine einfache Wasseraufnahme darstellt, kann man auch noch dadurch erreichen, daß man ein Deckglas mit angetrockneten Sporen auf einen Objektträger in einen Tropfen Bouillon legt. Die auf diese Weise in einer Nährlösung liegenden Sporen kann man so ebenfalls bei dem Quellungsvorgang sehr leicht im Mikroskop verfolgen (Abb. 1 bis 2). (Zweckmäßig ist es, das „Bouillon präparat" mit Vaseline abzudichten, damit die Bouillonkonzentration durch Verdunstung nicht zu sehr erhöht wird.) Je nach dem Stadium, das man wünscht, kann man dann die Quellung unterbrechen, das Präparat fixieren und färben. Dabei ist aber große Vorsicht geboten, weil die kurz vor der Keimung stehenden Stadien nur noch lose am Deckglas haften und bei der weiteren Verarbeitung der Präparate leicht abschwimmen.



Abb. 20. Sporenmutterzellen mit fertig ausgebildeten Sporen. Färbung mit Carminessigsäure. Neben den Sporen häufig das zugrunde gehende zweite Nucleoid (Pfeil!). Bei *a* der Spore dicht anliegend, bei *b* nur noch schattenhaft.

Der zweite Nuclealkörper der vegetativen Zelle geht während der Sporenbildung lang-

sam zugrunde. Er läßt sich aber meist noch zur Zeit, wenn die Spore reif ist, mit Carminessigsäure sehr gut darstellen (Abb. 20). Und diese zeigt dann auch, daß der außen *an* der Spore haftende Körper in der Sporenmutterzelle nichts anderes ist als der zweite noch nicht ganz zugrunde gegangene nuclealpositive Körper.

Besprechung der Befunde.

Die oben mitgeteilten Beobachtungen haben kurz zusammengefaßt folgendes ergeben: Jede keimfähige Spore von *B. mycoides* enthält einen *Feulgen*-positiven Körper. Wie man aus den verschiedenen Stadien schließen darf, teilt sich dieser kurz vor der Keimung, und aus der Spore tritt ein kurzes gedrungenes Stäbchen mit zwei Nuclealkörpern. Bei der weiteren vegetativen Vermehrung teilen sich diese in der schon früher beschriebenen Form. Bei der Sporenbildung geht einer der beiden zugrunde. Der zweite geht in die Spore ein. Damit ist die Kontinuität der *Feulgen*-positiven Zellelemente erwiesen. Wir haben in diesen Körpern Zellbestandteile vor uns, die sich *nur durch Teilung vermehren und niemals neu gebildet werden*. Jede lebensfähige Zelle enthält sie in typischer Zahl und Lagerung. Wie die positive Nuclealreaktion beweist, enthalten sie Thymonucleinsäure. Im übrigen verhalten sie sich genau so wie die kernähnlichen Strukturen, die von mir bei nicht sporenbildenden Bakterienarten nachgewiesen wurden. Deshalb halte ich sie für identische Gebilde und rechne sie also den *Nucleoiden* zu. Der Satz, der für die Kerne der höheren Organismen gilt: Omnis nucleus ex nucleo hat (in abgewandelter Form) auch für das Nucleoid Gültigkeit.

Damit konnten die Ergebnisse von *B. Stille* vollständig bestätigt werden, und der Einwand gegen seine Arbeitsergebnisse, daß er sie nur bei einer Hydrolyse von 40° C und 1 Stunde Einwirkungsdauer erzielen konnte, ist hinfällig geworden; denn die gleichen Strukturen wurden von mir auch bei der üblichen Hydrolyseart (58 bis 60° C) in klarer Ausprägung ohne eine diffuse Nuclealfärbung dargestellt. Damit dürften auch die Befunde von *Pietschmann* und *Rippel* und *Milovidov* endgültig widerlegt sein. Von einer diffusen Verteilung der Nuclealsubstanz kann nicht die Rede sein. Eine ,,Entmischung" braucht danach erst gar nicht stattzufinden. *Milovidov* hat offenbar die kernähnlichen Strukturen oft gesehen, aber die Zusammenhänge nicht erkannt; denn er fand ,,bei günstigen Bedingungen auch nucleale Einschlüsse" und zu Beginn der Sporenbildung ein bis zwei nuclealpositive Körnchen, die meist an den Polen lagen.

Beide Zustandsformen der *Feulgen*-positiven Substanz beschreibt *R. Schaede*: bei allen Bakterien diffuse Reaktion des Plasmas und außerdem bei manchen — so auch beim *B. mycoides* — besondere Körnchen.

Wie schon eingangs erwähnt, zweifelt *Schaede* überhaupt an dem Wert der Nuclealreaktion für die Darstellung von Kernsubstanz und geht dabei so weit, die Nuclealreaktion in HFA Reaktion (*H*ydrolyse-*f*uchsinschweflige Säure-*A*ldehydreaktion) umzubenennen, um zu verhindern, daß „der Sache gleich eine ganz bestimmte Richtung gegeben" wird. Mag es Skeptikern berechtigt erscheinen, die Spezifität der Nuclealreaktion in Zweifel zu ziehen, so ist es doch vollkommen ungerechtfertigt, den Namen dieser *Reaktion* zu ändern. Die Nuclealreaktion ist eine völlig geklärte rein chemisch-physiologische Angelegenheit und beruht auf der leichten Abspaltbarkeit der Purinkörper aus der Thymonucleinsäure und den dann frei zutage tretenden Aldehydgruppen der für die Thymonucleinsäure charakteristischen Desosegruppen. Wenn *Schaede*, wie sich Herr Prof. Dr. *Feulgen*[1] in einer diesbezüglichen Unterredung äußerte, physiologisch-chemisch stichhaltige Beweise dafür hat, daß seine Strukturen keine Thymonucleinsäure enthalten, wohl aber eine zum Verwechseln ähnliche Reaktion geben, so kann er höchstens sagen: die von mir (*Schaede*) beobachtete Reaktion ist keine Nuclealreaktion. In diesem Falle hätte er einen neuen Körper entdeckt, und man müßte von ihm den chemischen Beweis dafür verlangen.

Schaede führt verschiedene chemische und morphologische Gesichtspunkte an, die ihn veranlaßt haben, die nuclealpositiven Körper für Reservestoffe und nicht für Kernsubstanz zu halten. Er *glaubt* zunächst nicht an den spezifischen Nachweis von Thymonucleinsäure mit Hilfe der *Feulgen*schen Nuclealreaktion — denn einen chemischen Nachweis für ihre Unspezifität vermag er nicht beizubringen. Er schreibt nur: „Jeder zum Inventar der Zelle gehörende Körper, der bei der Hydrolyse ein Aldehyd abspaltet, muß also positive Reaktion zeigen, und es darf mit Recht bezweifelt werden, daß das ausschließlich bei der Thymonucleinsäure der Fall ist." Auch zu diesem Punkte äußerte sich Herr Prof. Dr. *Feulgen*: Wenn es andere Stoffe von Aldehydcharakter gäbe, die mit der Thymonucleinsäure verwechselt werden könnten, so müßten diese löslich sein, vor allem in organischen Lösungsmitteln. Bei den bisher bekannten im Pflanzenreich gefundenen Stoffen von Aldehydcharakter — z. B. Vanillin — trifft das auch zu. Zum mindesten aber müßte der Stoff (falls er in Bindung vorkäme) *nach der Hydrolyse* in organischen Lösungsmitteln löslich sein. Aber gerade die Unlöslichkeit der Thymonucleinsäure sowohl als Nucleoproteid als auch in freiem Zustande, als auch nach der Hydrolyse in organischen Solventien ist

[1] Herrn Prof. Dr. *Feulgen* möchte ich auch an dieser Stelle meinen besten Dank dafür sagen, daß er mir Gelegenheit zu einem Gedankenaustausch und die Ermächtigung zur Publikation seiner Mitteilungen gab.

außerordentlich charakteristisch. Herr Prof. Dr. *Feulgen* hat mir dazu noch folgendes mitgeteilt: „Eine theoretisch hundertprozentige Sicherheit besteht freilich nicht und kann gar nicht bestehen, aber dies beruht nicht auf einer angeblichen Unzuverlässigkeit der Nuclealreaktion, sondern liegt im Wesen einer *jeden* histochemischen Reaktion begründet: denn es besteht an sich immer die Möglichkeit, daß es hier und da noch unbekannte Stoffe gibt, welche eine ähnliche Reaktion geben. Indessen sind die Umstände, unter denen die Nuclealreaktion zustande kommt, derartig eingeengt, ungewöhnlich und damit spezifisch, daß man nach unseren heutigen Kenntnissen in der Biochemie aus einer richtigen Nuclealreaktion mit einer an Sicherheit grenzenden Wahrscheinlichkeit auf die Anwesenheit von Thymonucleinsäure schließen darf. Aber selbst wenn ein neuer, noch unbekannter Stoff gefunden werden sollte, der eine ähnliche Reaktion gibt, so würde dadurch die Nuclealreaktion doch nicht unbrauchbar, oder gar durch einen neuen Namen ersetzt werden müssen, sondern es müßten Methoden ausgearbeitet werden (und solche sind durchaus denkbar), mit denen man die Nuclealreaktion von jener neuen Reaktion unterscheiden kann. Ein Schulbeispiel für ein solches Vorgehen ist die *Plasmalreaktion*, die anfänglich ein sehr unerwünschter Nebenbefund war und die Nuclealreaktion ernstlich in Frage stellte, dann aber von der Nuclealreaktion scharf unterschieden werden konnte und zur Entdeckung und strukturellen Aufklärung der *Acetalphosphatide* führte. Eine andere Einstellung wäre gleichbedeutend mit wissenschaftlichem Nihilismus gewesen". In seiner Schrift: „Von der Nuclealfärbung zum Plasmologen" hat sich *Feulgen* (1939) übrigens zusammenfassend zu diesem ganzen Fragenkomplex geäußert. Wegen der besonderen Bedeutung dieser Schrift sei auf sie ausdrücklich hingewiesen.

Merkwürdigerweise wird die Brauchbarkeit der *Feulgen*schen Nuclealreaktion zur Darstellung und zum Nachweis von Kernsubstanz gerade bei bakteriologischen Arbeiten immer wieder in Zweifel gezogen. Bei tierischem und pflanzlichem Zellmaterial dagegen wird sie seit Jahren ohne wesentliche Bedenken zum Studium des Feinbaues von Kern und Chromosomen herangezogen. Dabei war chemisch-analytisch nur an Kernen *tierischer* Herkunft die Thymonucleinsäure präparativ nachgewiesen worden, und in den Pflanzen vermutete man die nuclealnegative Hefenucleinsäure als typischen Bestandteil der Zellkerne. Dennoch wurde die Nuclealreaktion in großem Umfange bei pflanzlichen Kernuntersuchungen angewendet und keiner zweifelte ernstlich an ihrer Spezifität, obgleich präparativ Thymonucleinsäure gar nicht im pflanzlichen Zellkern nachgewiesen war. Diesen Nachweis erbrachten erst vor 3 Jahren *Feulgen, Behrens* und *Mahdihassan* (1937). Es heißt in dieser Arbeit (S. 205): „Man kann ohne Übertreibung sagen, daß wir über die

Zusammensetzung der pflanzlichen Zellkerne bisher überhaupt nichts wissen; denn das wenige, was wir zu wissen geglaubt haben, hat sich als falsch erwiesen." Mit Hilfe einer eigens für diese Prüfungen ausgearbeiteten Methode zur Isolierung von Zellkernen aus pflanzlichen Geweben gelang es, reine Thymonucleinsäure mit den vier für Thymonucleinsäure charakteristischen Basen: Guanin, Adenin, Cytosin und Thymin darzustellen.

Vor der gleichen Situation wie zur Zeit *vor* der zitierten Arbeit von *Feulgen* und Mitarbeitern (1937) stehen wir aber heute in bezug auf die Bakterien: aus isolierten Nucleoiden ist Thymonucleinsäure noch nicht dargestellt worden. Aber der positive Ausfall der Nuclealreaktion läßt den Schluß zu, daß die kernähnlichen Strukturen Thymonucleinsäure enthalten.

Nebenbei sei erwähnt, daß gelegentlich dieser Untersuchungen von *Feulgen*, *Behrens* und *Mahdihassan* auch festgestellt wurde, daß Hefenucleinsäure gar nicht in pflanzlichen Zellkernen vorkommt, sondern daß diese, die *keine* positive Nuclealreaktion gibt, nur im *Plasma* der Pflanzenzelle gefunden wird. „Damit hat die Hefe‚nucleinsäure' ihren Namen von einer Eigenschaft, die sie gar nicht besitzt." (*Feulgen* 1939.)

Außerdem haben viele Autoren den Nachweis geführt, daß in Bakterien aller Art Nucleinsäuren, Nucleoproteide, ja selbst Thymonucleinsäure chemisch-analytisch zu finden ist, und gezeigt, daß grundsätzlich die chemische Zusammensetzung der Bakterienzelle im wesentlichen übereinstimmt mit der tierischen und pflanzlichen Zelle. (Vgl. die ausführlichen Untersuchungen und Referate von *L. Mesrobianu*, 1936.)

Einen indirekten Hinweis auf die chemische Zusammensetzung der Nucleoide hat vor kurzem die elektronenoptische Untersuchung von Bakterien und Bakteriophagen ergeben. *Pfankuch* und *Kausche* (1940) gelang es, hoch gereinigte Bakteriophagen elektronenoptisch im Übermikroskop nach *E. Ruska* und *v. Borries* darzustellen. Dabei wurde beobachtet, daß die Phagen der Colibakterien bei langer intensiver Bestrahlung durch die Elektronen destruiert werden können, so daß schließlich hohlkugelige oder ringartige Gebilde übrig bleiben. *H. Ruska* konnte nun beim elektronenoptischen Studium der bakteriellen Lyse durch Bakteriophagen die Beobachtung machen, daß auch Einschlüsse, die an den Stellen in den Bakterien liegen, wo die kernähnlichen Strukturen zu erwarten sind, auf gewissen Entwicklungsstadien die gleiche Reaktion auf die Bestrahlung zeigen. Das gleichartige Verhalten der Phagen und der Zelleinschlüsse läßt die Möglichkeit zu, daß Phagen und kernähnliche Strukturen substantiell ähnlich aufgebaut sind. Die erörterte „Möglichkeit" hat neuerdings sogar recht viel Wahrscheinlichkeit für sich; denn *Northrop* (1938) hat feststellen können, daß der Phage (eines *Staphylococcus*), der auf praktisch proteinfreiem Nährboden gezüchtet

wurde, die *Zusammensetzung eines Nucleoproteins hat*. Hydrolysierte Phagen gaben mit Alkali-Silbernitrat einen Niederschlag, der auf Purinbasen schließen läßt. Mit diesen Feststellungen dürfte ein weiterer Anhaltspunkt für den chemischen Aufbau der Nucleoide aus *Nucleoproteinen* gewonnen sein.

An dieser Stelle müssen noch einige andere Punkte der *Schaede*schen Arbeit einer Kritik unterzogen werden. *Schaede* fand neben *Feulgen*-positiven Körnchen stets noch eine diffuse Färbung der Zelle, die er gleichfalls als echte Nuclealfärbung anspricht. Wie schon eingangs erwähnt, liegt bei dieser Beobachtung vielleicht ein Fehler in der Technik zugrunde. Spülung der in fuchsinschwefliger Säure gefärbten Präparate in SO_2-haltigem Wasser allein gibt nach unseren Erfahrungen kein absolut farbloses Plasma, dagegen bleiben die Präparate ohne diffuse Färbung, wenn anschließend an die SO_2-Spülung die Auswaschung der schwefligen Säure unter schnell fließendem Leitungswasser vorgenommen wird. Ich halte deshalb die diffuse Anfärbung auf keinen Fall für eine echte *primäre* Nuclealfärbung. Es besteht aber vielleicht eine Erklärungsmöglichkeit für das Auftreten einer echten diffusen Nuclealfärbung. Es ist eine bekannte Erscheinung, daß schwache Hydrolyse (bei 58 bis 60° C, 2 bis 4 Minuten) nur schwache Nuclealreaktion ergibt, optimale Hydrolyse von 8 bis 10 Minuten zeitigt kräftige Nuclealreaktion und übertrieben lang andauernde Hydrolyse (25 bis 30 Minuten) eine vollkommen diffuse Färbung. Aus dieser Tatsache, die für die meisten Zellkerne und Chromosomen gilt, geht hervor, daß der Vorgang der Nuclealreaktion, insbesondere die Hydrolyse, nicht erst nach Erreichung eines bestimmten Schwellenwertes abläuft, sondern schon nach erster kurzer Einwirkung der Salzsäure. Es werden also schon nach kurzer Zeit die ersten Moleküle der Thymonucleinsäure gespalten, und zur Zeit der optimalen Hydrolysedauer ist die hydrolytische Spaltung der *meisten* Moleküle erfolgt. Die einzelnen Moleküle werden also nicht alle zu gleicher Zeit gespalten, sondern zum Teil nacheinander. Bei zu langer Hydrolyse zeigt aber die dann auftretende diffuse Färbung, daß die reagierende Substanz aus ihrem Substrat, an das sie gebunden war, ausgewandert sein muß, und auch hier kann man, wie bereits *Stille* an Zellen von *Allium cepa* u. a. beobachtete, nachweisen, daß dieser Vorgang nicht plötzlich erfolgt, sondern in Abhängigkeit von der Stärke der Hydrolyse. Damit ist aber — zunächst theoretisch — gezeigt, daß zur Zeit der optimalen Hydrolysedauer die ersten hydrolytisch gespaltenen Moleküle der Thymonucleinsäure schon aus ihrem Substrat ausgewandert sein können und somit eine echte, *sekundär diffuse* neben einer echten *primär lokalisierten* Nuclealreaktion in einer Zelle auftreten kann. Ob diese diffuse Färbung immer zu sehen sein wird, ist dabei eine andere Frage, zumal das bei der Nucleal-

färbung wirksame Agens — die Thyminsäure — wasserlöslich ist und deshalb leicht aus der Zelle heraus diffundieren kann. Wenn also — was oben bezweifelt wurde — die von *Schaede* beobachtete diffuse Nuclealreaktion neben der lokalisierten tatsächlich auftreten sollte, könnte man sie auf Grund dieser Überlegungen und Beobachtungen durchaus plausibel erklären. Möglich wäre lediglich ein Unterschied in den Adsorptionseigenschaften des Substrats zwischen Bakterien und Pflanzen, Eigenschaften, die den wesentlichen Anteil des Kerns nicht zu betreffen brauchen. Doch hier läßt sich vorerst nichts beweisen, nur vermuten.

Der Grund, weshalb *Schaede* zu seiner merkwürdigen Auffassung von der nuclealgefärbten Substanz kommt, ist wohl darin zu sehen, daß er jede Anfärbung der Zelle als Primärstruktur und echte Nuclealfärbung anspricht; aber es ist von vornherein sehr unwahrscheinlich, daß bei den Bakterien echtes Chromatin (Thymonucleinsäure) in Form von Körnchen *und* in diffuser bzw. für unser Auge diffus erscheinender Substanz gleichzeitig nebeneinander vorkommt, und wahrscheinlicher, daß die Kernsubstanz nur in einer der beiden Zustandsformen auftritt. Diesen Gedanken hatte offenbar auch *Schaede*, als er die Körper als Reservestoffe deuten zu müssen glaubte. Immerhin vorstellbar wäre ein Nacheinander verschiedener Zustände, wie es z. B. von *Pietschmann* und *Rippel* bei der von ihnen angenommenen ,,Entmischung" auftreten würde. (Vgl. in diesem Zusammenhang die Arbeit von *O. v. Plotho* über die chromatische Substanz bei *Actinomyceten*, 1940.)

Es sei aber nochmals darauf hingewiesen, daß *Feulgen* (1939) immer wieder die absolute Elektivität der Nuclealreaktion betont, die darauf beruht, daß *im Protoplasma die Thymonucleinsäure fehlt* — im Gegensatz zu anderen ,,Nuclein"-Säuren, die aber alle keine positive Nuclealreaktion eingehen (*Feulgen* 1939).

Damit dürfte der chemische Teil der *Schaede*schen Einwände besprochen sein. Es besteht nach dem heutigen Stand unseres Wissens keinerlei Veranlassung dazu, den Wert der Nuclealfärbung für die Zellkernforschung anzuzweifeln. Alle Umstände sprechen dafür, daß *die chemische Zusammensetzung der Nucleoide sehr ähnlich, ja höchst wahrscheinlich im wesentlichen sogar gleich der der Zellkerne höherer Organismen* ist.

Wie steht es nun mit der morphologischen und biologischen Seite des Problems? *Schaede* sagt ganz mit Recht: ,,Es kommt hier ja nicht lediglich auf die chemische Zusammensetzung der Körperchen an, sondern wesentlich auch auf ihre Funktion im Lebensgetriebe der Bakterien, und darüber wissen wir so gut wie nichts."

Wie auch *Schaede* (1939, S. 482) beobachtet hat, gibt es — auch schon auf relativ jungen Kulturplatten — zwei verschieden strukturierte

Zellarten: eine Form ohne Vakuolen und eine mit meist mehreren Vakuolen. Es ist auch richtig, daß beide Arten „in ein und derselben Kette unmittelbar nebeneinander liegen und damit ihre Zusammengehörigkeit beweisen". Das besagt aber nicht, daß die Strukturen beider Zellformen gleichartig zu bewerten und auf eine Stufe zu stellen sind (Abb. 10). Vielmehr haben unsere Prüfungen gezeigt, daß der größte Teil der vakuolisierten Bakterienzellen *nicht mehr lebensfähig* ist. Damit verlieren aber die Versuche, die unregelmäßige Vielzahl der *Feulgen*-positiven Körnchen in den vakuolisierten Bakterien zu deuten und in Gegensatz zu der Auffassung von der Kernähnlichkeit der Körper bei normaler Zwei- bzw. Vierzahl zu bringen, jeden Wert.

Bei der Besprechung seiner Ergebnisse beschreibt *Schaede* zunächst auch die normalen cytologischen Verhältnisse, von denen er selbst sagt (S. 500), daß die Teilung der nuclealpositiven Körnchen, die regelmäßige Weitergabe an die Tochterzellen, sowie das Auftreten bestimmter Zahlen sehr auffallend sei und als „Stütze für die Annahme kernartiger Organe" erscheinen. Er gibt auch noch zu, daß es bei *B. mycoides* „einwandfrei gesunde Zellen ohne Körnchen nicht gibt". Dann aber wird *Schaede* durch Zellformen mit einer unregelmäßigen Vielzahl von Nuclealkörnchen „an einen Reservestoff erinnert, zumal wenn man sich das Verhalten von *B. mycoides* vergegenwärtigt, wo es eine Form mit zwei bzw. vier Körnchen ohne Vakuolen als Jugendzustand gibt und eine mit vielen Körnchen und vielen Vakuolen, einen Zustand der Speicherung von Reservestoffen". Auf den zuletzt geäußerten Gedanken kann man allerdings angesichts der zahlreichen fetthaltigen Vakuolen kommen. Wahrscheinlicher aber ist es, daß wir hier bei Bakterien die aus der Histo-Pathologie bekannte Erscheinung der „fettigen Degeneration" vor uns haben. — Die Vielzahl der nuclealpositiven Körper dürfte auf einen postmortalen Zerfall der Nucleoide zurückzuführen sein.

Zu einem wesentlichen Punkt für die Deutung der *Feulgen*-positiven Körper hat *Schaede* ihr Verhalten bei der Sporenbildung gemacht. Er schreibt (S. 503): „Wenn je ein Körnchen in die Sporen einginge, würde man darin einen Hinweis auf ihre chromatische Natur erblicken können. Das ist aber nicht der Fall, bei keinem *Bacillus* konnte nachgewiesen werden, daß innerhalb der Sporen ein Körnchen liegt, im Gegenteil haften sie außen an der Sporenanlage und nach Fertigstellung der Membran an ihrer Außenseite". Fortfahrend gibt er dann aber zu, daß bei *B. mycoides* die Spore sich überhaupt nicht färben läßt, daß man „darum keine bestimmte Aussage über die Verhältnisse in ihrem Innern machen" kann.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit ist mitgeteilt worden, daß wir auf manchen Stadien der Sporenbildung ebenfalls keine Nuclealkörper

in der Spore darstellen konnten. Insbesondere versagte die sonst angewandte Methodik der Nuclealfärbung bei Sporen, die gerade reif waren, aber noch in der Sporenmutterzelle lagen. Durch Verlängerung der Hydrolysezeit von 10 auf 30 bis 35 Minuten ließen sich aber die Nucleoide auch *in* den Sporen darstellen. Die Sporenmembran ist offenbar derart, daß die normale Salzsäure nach 10 Minuten noch nicht bis ins Sporeninnere vorgedrungen ist. Der zweite Weg über die Quellung der Sporen auf frischem Nährboden hat auch *ohne* Verlängerung der Hydrolysezeit die Darstellung der Nucleoide mit der Nuclealfärbung ermöglicht. Es steht also außer jeder Frage, daß auch die *Sporen von B. mycoides auf jedem Stadium der Entwicklung einen Feulgen-positiven Körper, ein Nucleoid, enthalten.* Damit ist aber der wesentlichste Einwand von *Schaede* gegen die Kernnatur der *Feulgen*-positiven Substanz, ihr Fehlen in der Spore und die damit notwendig werdende Neubildung der Nuclealkörper in der aus der Spore entstehenden vegetativen Zelle, gefallen; denn mit dem Nachweis der Nucleoide *in* den Sporen ist — wie zu Beginn der Besprechung eingehend betont — die Kontinuität der kernähnlichen Strukturen bewiesen, und auch *Schaede* wird zugeben müssen, daß in diesem Nachweis „ein Hinweis auf ihre chromatische Natur" erblickt werden muß.

In der Auffassung, daß ein Teil der in der vegetativen Zelle vorhandenen nuclealpositiven Substanz in die Spore eingeht, sind sich auch — mit Ausnahme von *Schaede* — die Autoren einig. Nach *Pietschmann* und *Rippel* geht die nuclealpositive Substanz der vegetativen Zelle „nicht restlos in die Spore ein". *Milovidov* beobachtete, daß die Nuclealstoffe „lokalisiert und *in* den Sporen als vollkommen deutlich gefärbte kompakte Chromatinpartikel kondensiert" werden. — *B. Stille* hat sich bei seinen Untersuchungen ganz besonders dem Verhalten der *Feulgen*-positiven Zellelemente bei der Sporenbildung gewidmet und Ergebnisse erzielt, deren Deutung durch verschiedene Beobachtungen gesichert wurden. Seine Arbeiten führten ihn zu dem Schluß, daß die Sporen ein nuclealpositives Körnchen enthalten. Bei der Sporenbildung wird nach ihm der Spore das eine von den beiden nuclealpositiven Körnchen der vegetativen Zelle mitgegeben, während das zweite nach dem Freiwerden der Spore mit dem Mutterzellrest zugrunde geht.

Zusammenfassend muß also festgestellt werden, daß weder die chemischen, noch die morphologischen, noch die biologischen Einwände von *Schaede* die Auffassung von der Kernähnlichkeit der nuclealpositiven Strukturen bei *B. mycoides* zu erschüttern vermögen. Die Spezifität der *Feulgen*schen Nuclealreaktion ist bisher durch keinen chemischen Gegenbeweis in Frage gestellt worden, und die diesbezüglichen Untersuchungen chemischer und physikalisch-chemischer Art haben immer wieder gezeigt, daß die Bakterien — insbesondere *B. mycoides* —

Strukturen enthalten, die eine mindestens sehr ähnliche, wenn nicht sogar gleiche Zusammensetzung haben wie Zellkerne. *Schaede* unternimmt es, nicht mit chemischer Beweisführung, sondern aus morphologischen Erwägungen heraus — nämlich wegen der im Alter auftretenden Vielzahl von *Feulgen*-positiven Körper — Zweifel in die Spezifität der Nuclealreaktion zu setzen. Diese morphologischen Erwägungen sind aber gegenstandslos, weil sie sich auf sekundär veränderte Strukturen abgestorbener Bakterien stützen. Wenn man noch den Nachweis der kernähnlichen Strukturen *in* den Sporen berücksichtigt, darf man wohl sagen, daß die Auffassung von *Schaede* über die Bedeutung der nuclealpositiven Strukturen zu Unrecht besteht. Das unbestreitbar positive Ergebnis der Arbeit von *Schaede* besteht in dem Nachweis und damit der Bestätigung, daß in „jungen" Kulturen zwei bis vier nuclealpositive Körnchen je Zelle vorhanden sind. *Schaedes Beobachtungen* an den verschiedenen vegetativen Zellen stimmen — was Zahl, Gestalt und Lage der nuclealpositiven Körper angeht — vollkommen mit unseren überein*.

Die Untersuchungsergebnisse zeigen also, daß auch *Bacillus mycoides Flügge* in jeder lebensfähigen Zelle gesetzmäßig zwei Körper besitzt, die einen typischen Bestandteil der Zellkerne, die Thymonucleinsäure, enthalten. Die verschiedenen Teilungsstadien lassen den Schluß zu, daß sie sich vor jeder Zellteilung auch selbständig teilen, so daß beide Tochterzellen wiederum je zwei Körper enthalten. Wir haben demnach bei diesem Bakterium die gleichen cytologischen Verhältnisse, wie sie schon bei nicht-sporenbildenden Arten von mir gefunden und beschrieben wurden (*Piekarski* 1937, 1939). *Es existieren somit auch bei B. mycoides kernähnliche Strukturen, Nucleoide.* Diese Strukturen sind allem Anschein nach bei den Bakterien allgemein verbreitet, während *die Mycelien bei Actinomyceten,* wie neuere Untersuchungen von *O. v. Plotho* ergeben haben, *diffuse Nuclealreaktion* zeigen (vgl. auch *Schaede,* 1939).

Ausdrücklich möchte ich hier noch betonen, daß ich keinerlei Beobachtungen machen konnte, die auf sexuelle oder genetische Vorgänge schließen ließen (vgl. die angeblichen Beobachtungen und Deutungen von *Allen, Applby* und *Wolf,* 1939 und die Entgegnung *Schaedes* 1939, S. 504ff.).

* Hier sei noch ein Mißverständnis (*Schaede,* Fußnote S. 494) bezüglich meiner Angaben über *B. pyocyaneum* (*Piekarski,* 1939, S. 141) richtiggestellt: *B. pyocyaneum* besitzt *Feulgen*-positive Körnchen *nicht nur,* wenn es höchstens 18—24 Stunden alt ist, sondern bis zu diesem Zeitpunkt „findet man in den Zellen regelmäßig *zwei* nahe den Zellenden gelegene nuclealpositive Körper". „Prüft man ältere Kulturen, dann findet man zuerst wenige, später ausschließlich kleinere Bakterien, die sich von den ersten dadurch wesentlich unterscheiden, daß sie nur *einen* zentral gelegenen Körper tragen." Wenn später die Körnchen verschwinden, dann sind die Bakterien nicht mehr lebensfähig.

Die Prüfung der Absorptionsverhältnisse im ultravioletten Licht hat bei neueren Versuchen mit Bakterien vollständig versagt, weil — wie ich schon früher mitteilte — die Bakterien insgesamt (wohl wegen der Eigenart der Bakterienhülle) die ultravioletten Strahlen so stark absorbieren, daß *in* den Bakterien keinerlei Strukturen darzustellen sind. Hinzu kommt, daß die notwendigen Prüfungen mit verschiedenen Wellenlängen, die erst einen wirklichen Beweis für die selektive Absorption liefern würden, mir zur Zeit nicht möglich sind. So bleibt neben dem biologischen Verhalten vorerst die positive *Feulgen*-Reaktion allein als Beweis für die chemische Identität von Nucleus und Nucleoid.

Neuerdings haben die cytologischen Befunde an den Bakterien eine gewisse Stütze von der physikalisch-theoretischen Seite erfahren. Seit einiger Zeit versucht *Jordan* (1938, 1939) auf Grund biologischer Wirkungen von Strahlungsquanten auf Bakterien den theoretischen Nachweis zu führen, daß diese ein lokalisiertes „Steuerungszentrum", das er in einem „Miniaturkern" erblickt, besitzen müssen.

Zusammenfassung.

In jeder *lebensfähigen* vegetativen Zelle von *Bacillus mycoides Flügge* lassen sich mit Hilfe der *Feulgen*schen Nuclealreaktion sowie mit Giemsafarbstoff nach Eosindifferenzierung zwei (oder ein Mehrfaches davon) nuclealpositive Körper darstellen, die genau das gleiche Verhalten zeigen, wie die schon früher beschriebenen kernähnlichen Strukturen oder Nucleoide nicht-sporenbildender Bakterien. Bei der Sporenbildung geht einer der beiden Körper *in* die Spore ein, während der zweite zugrunde geht. Eine diffuse Nuclealreaktion konnte bei gesunden, lebensfähigen Formen niemals beobachtet werden.

Die Darstellung der Nucleoide in den Sporen mit der *Feulgen*schen Nuclealreaktion gelingt entweder durch Erhöhung der Hydrolysezeit auf 30 bis 35 Minuten oder — mit normaler Hydrolysedauer von etwa 10 Minuten — nach Quellung der Sporen durch Zuführung frischen Nährbodens. Die Nucleoide liegen dann mitten in der Spore. Kurz vor der Keimung teilt sich das Nucleoid, so daß das aus der Spore „schlüpfende" Stäbchen schon die normale Zahl von zwei Körpern besitzt.

Die Beobachtungen von *Schaede* an den vegetativen Bakterienformen konnten — was die Gestalt und Lage der *Feulgen*-positiven *Körper* angeht — bestätigt werden, doch müssen seine Deutungen aus chemischen, morphologischen und biologischen Gründen abgelehnt werden.

Literatur.

Allen, L. A., J. C. Appleby and *J. Wolf*, Centralbl. Bakt., II, Abt. **100**, 3, 1939. — *Badian, J.*, diese Zeitschr. **4**, 409, 1933. — *Brunstetter, B. C.*, u. *C. A. Magoon*, J. Bact. **24**, 85, 1932, II. — *Dooren de Jong, L. E.*, diese Zeitschr. **4**, 36, 1933. — *Feulgen, R., M. Behrens* u. *S. Mahdihassan*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **246**, 203, 1937. — *Feulgen, R.*, Von der Nuclealfärbung zum Plasmalogen, Schriften der Ludwigs-Universität zu Gießen, 1939, Heft 1. — *Fortner, J.*, Naturwiss. **28**, 699, 1935. — *Frühbrodt, E.*, u. *H. Ruska*, diese Zeitschr. **11**, 137, 1940. — *Geitler, L.*, Schnellmethoden der Kern- und Chromosomenuntersuchung. Berlin, Borntraeger, 1940. — *Holzmüller, K.*, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **23**, 304, 1909. — *Hu, K.*, The Journal of the Chosen Medical Association **25**, 29, 1935. — *Jordan, P.*, Zeitschr. f. techn. Physik, 19. Jahrg., 389, 1938. — *Derselbe*, Archiv Virusforschung **1**, 1, 1939. — *Lewis, M. I.*, J. Bact. **24**, 381, 1932, II. — *v. Loghem, J. J.*, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., **120**, 318, 1931. — *Mesrobianu, L.*, Contribution à l'étude des corps puriques de la cellule bactérienne, Thèses présentées à la faculté des sciences de l'Université de Straßbourg, Paris 1936. — *Milovidov, P. F.*, diese Zeitschr. **6**, 475, 1935. — *Northrop, J. H.*, J. of general physiol. **21**, 335, 1938. — *Pfankuch, E.*, u. *G. A. Kausche*, Naturwiss., 28. Jahrg., 1940. — *Piekarski, G.*, diese Zeitschr. **8**, 428, 1937. — *Derselbe*, ebenda **10**, 302, 1939a. — *Derselbe*, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., **144**, 140, 1939b. — *Pietschmann, K.*, u. *A. Rippel*, diese Zeitschr. **3**, 422, 1932. — *v. Plotho, O.*, diese Zeitschr. **11**, 285, 1940. — *Ruska, H.*, Naturwiss., 28. Jahrg., 1940. — *Schaede, R.*, diese Zeitschr. **10**, 473, 1939. — *Stapp, C.*, u. *H. Zycha*, ebenda **2**, 493, 1931. — *Stille, B.*, ebenda **8**, 125, 1937.

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.)

Versuche über die zahlenmäßige Veränderung der natürlichen Bakterienflora in den Verdauungsorganen der Wiederkäuer*.

Von

Werner Köhler.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 9. November 1940.)

Während die Tiere im allgemeinen nicht in der Lage sind, Stickstoffverbindungen nichteiweißartiger Natur unmittelbar zum Aufbau ihres Körpereiweißes zu verwerten, nehmen die Wiederkäuer nach einigen Autoren in dieser Hinsicht eine Sonderstellung ein. Dieses ist der Gegenstand zahlreicher Fütterungsversuche gewesen, da die Frage praktisch großes Interesse hat. Die Versuche wurden so durchgeführt, daß man die Eiweißmenge errechnete, die das Versuchstier zur Erhaltung seines Lebens (bzw. seiner Körpersubstanz) unbedingt benötigte, während man eine Ration verfütterte, die so eiweißarm war, daß diese allein nicht zur Deckung des Eiweißbedarfes ausreichen konnte; dafür enthielt sie pflanzliche Amide in genügender Menge, die bei einzelnen Versuchen zum Teil durch synthetische Stickstoffverbindungen ersetzt wurden. Die Versuchsergebnisse waren teils negativ, teils positiv bei geeigneter Futterzusammenstellung, so daß die Frage, ob eine Verwertung dieser Stoffe durch das Tier tatsächlich erfolgt, nicht eindeutig beantwortet werden konnte.

Es entstanden nun zwei Theorien, die eine Verwertung von Amiden durch Wiederkäuer unter Mitwirkung von Bakterien erklären sollen. Die eine, von *Zuntz*, besagt, daß die Amide des Futters leicht von den Mikroorganismen verwertet werden können, wodurch sie von dem eigentlichen Futtereiweiß abgelenkt werden, so daß dieses dann dem Tier in erhöhtem Ausmaße zur Verfügung steht. Die andere, von *Hagemann*, besagt, daß die Mikroorganismen den Amidstickstoff bzw. Stickstoff der synthetischen N-Verbindungen zum Aufbau ihrer Körpersubstanz benutzen, die dann dem Tier in Form von Bakterieneiweiß zufließt.

Es sollte nicht die Aufgabe dieser Arbeit sein, zu untersuchen, wie weit die erwähnten oder andere Theorien für das Verhalten der Wieder-

* D 7.

käuer hinsichtlich der Verwertung der Amide bzw. synthetischen Stickstoffverbindungen zutreffen, vielmehr sollte versucht werden, die Bakterien, die im Pansen, Dünndarm und Dickdarminhalt *normal gefütterter* Rinder stets vorkommen, zahlenmäßig zu bestimmen, um so einen Anhaltspunkt dafür zu gewinnen, wie weit normalerweise Bakterieneiweiß zur Resorption zur Verfügung stehen könnte. Es sollte also eine bisher fehlende zahlenmäßig-bakteriologische Ergänzung zu den bereits vorliegenden gewichtsmäßigen Methoden gegeben werden. Weiterhin sollte festgestellt werden, ob die vorkommenden Bakterien auch unter anaeroben Verhältnissen in der Lage sind, aus einer synthetischen Nährlösung, die Harnstoff als N-Quelle enthielt, wesentliche Eiweißmengen aufzubauen. Die gewonnenen Zahlen sollten dem Tierphysiologen Unterlagen bieten, etwas über eine mögliche Mitwirkung der Bakterien an der Eiweißversorgung der Wiederkäuer aussagen zu können.

Die mengenmäßige Bestimmung der Bakterien.

Ankersmit bestimmte die in den Verdauungsorganen von Schlachthausrindern vorkommenden Bakterien auf Gelatineplatten und in Dextrose-Agar in hoher Schicht (nach *Burri*) und teilt folgende Zählungen mit:

Auf Gelatineplatten: Pansen 70000 bis 900000, Dünndarm 2000 bis 180000. Auf Dextroseagar in hoher Schicht: Pansen 2160000 bis 15000000, Dünndarm 3000 bis 700000.

Die Bakterienmengen im Pansen der Wiederkäuer bestimmten *Schwarz* sowie *Mangold* (1) und Mitarbeiter indirekt dadurch, daß sie die Stickstoffverteilung im Pansen untersuchten und den Stickstoffanteil der Bakterien am Gesamtstickstoffgehalt des Pansens errechneten. Sie gingen hierzu folgendermaßen vor: Eine abgewogene Menge des Panseninhaltes wurde mit Wasser vermischt, durchgeschüttelt, und durch eine Nutsche mit mehrfacher Papiereinlage filtriert. Im Filtrat befanden sich die Bakterien sowie der gelöste Stickstoff, während der Filterrückstand die Infusorien und die Futterreste enthielt. Es wurden nun Stickstoffbestimmungen (nach *Kjeldahl*) vorgenommen, und zwar einmal in der Flüssigkeit, die die Bakterien und den gelösten Stickstoff enthielt, zum anderen in dem bakterienfreien Filtrat, das aus der ersten Fraktion (Bakterien + gelöster N) unter Verwendung eines Bakterienfilters gewonnen wurde. Die Differenz der beiden Werte ergab den Bakterienstickstoff.

Schwarz bestimmte so den Gesamtstickstoffgehalt im Pansen von Schlachthausrindern zu 0,13 % und den Stickstoffanteil der Bakterien daran zu 11,7 %, mit Schwankungen von 8,1 bis 17,5 %. *Mangold* und Mitarbeiter bestimmten nach der gleichen Methode den Gesamtstickstoff im Panseninhalt (Hammel) zu 0,2 bis 0,3 % und den Stickstoffanteil der Bakterien daran zu 10 %, mit Schwankungen von 5 bis 9 % bei einem, und 11 bis 16 % bei einem zweiten Tier.

Beide Autoren halten die so gefundenen Werte für Annäherungswerte, und *Mangold* weist darauf hin, daß in dem Filtrat der Fraktion Futterreste d Infusorien auch noch Futterpartikel vorhanden waren. Er glaubt och, daß hierdurch kein großer Fehler entsteht, da auf der Nutsche einige akterien zurückgehalten werden, und daß sich beide kompensieren.

Eigene Untersuchungen.

Material und Probeentnahme.

Das Material für vorliegende Untersuchungen entstammt den Verdauungsorganen von Schlachthausrindern. Die Proben aus dem Pansen, Dünndarm und Dickdarm wurden so steril entnommen, wie dieses unter den Umständen möglich war.

Die größten Schwierigkeiten bereitete die Probeentnahme aus dem Pansen, weil die festen Bestandteile des Inhaltes mehr oder weniger von der Pansenflüssigkeit abgesondert sind, so daß es äußerst schwierig war, eine gute Durchschnittsprobe zu erhalten. Die Bestimmung der Trockensubstanz (Tabelle I) kann zur Beurteilung, wie weit dieses in den einzelnen Fällen gelang, nicht allein herangezogen werden, da der Panseninhalt nicht immer gleich gut durchfeuchtet war. Bei manchen Tieren hatte der Inhalt eine breiige, sehr flüssige Konsistenz, während er bei anderen außerordentlich fest war. Der Pansen wurde aufgeschnitten und aus der Mitte des Inhaltes etwa 500 g unmittelbar in sterile Gefäße gefüllt. Bei sehr flüssigem Inhalt lief das Material von selbst in das Gefäß, während bei festem Inhalt mit einem sterilen Spatel eingefüllt werden mußte. Die Reaktion war stets schwach alkalisch; es konnte Ammoniak nachgewiesen werden.

Nachdem der Dünndarm von den übrigen Verdauungsorganen abgetrennt war, wurden aus dem oberen Teil (Zwölffingerdarm) etwa 500 g direkt in sterile Gefäße gefüllt. Die Reaktion war stets schwach sauer.

Die Proben aus dem Dickdarm wurden auf die gleiche Art entnommen, und zwar ebenfalls immer aus dem oberen Teil des Darmes (Grimmdarm). Die Reaktion war neutral-schwach alkalisch.

Bestimmung der Bakterienzahlen.

1. Plattenmethode.

Von dem Material wurden sofort je zwei voneinander unabhängige Verdünnungen (10^3) hergestellt, indem 20—30 g in einem sterilen Kolben mit der entsprechenden Menge sterilen Wassers versetzt wurden. Nach kräftigem Durchschütteln wurden von diesen Verdünnungen je vier Platten gegossen, also acht Platten aus jedem Darmabschnitt.

Als Nährboden diente Bouillon-Agar, schwach alkalisch. Aus technischen Gründen wurden die Platten zuerst unter einer feuchten Glasglocke bei nicht ganz gleichmäßiger Temperatur (etwa 37° C) im Brutzimmer aufbewahrt. Unter diesen Umständen mußten die Platten bereits nach 24 Stunden ausgezählt werden, da bei längerer Bebrütung meist eine so starke Verschimmelung eintrat, daß dann ein Auszählen der Kolonien nicht mehr möglich war.

Die Zählung der Kolonien erfolgte mit Hilfe einer schwach vergrößernden Lupe auf einer mit Quadraten versehenen schwarzen Glasplatte als Unterlage.

Da es später möglich war, die so hergestellten Platten bei absolut gleichmäßiger Temperatur (37° C) im Thermostaten zu bebrüten, wurden noch einmal sechs Rinder auf die gleiche Art untersucht. Die Platten wurden hierbei jedoch 5 Tage bebrütet. Eine längere Bebrütung ergab keinen Zuwachs mehr. Die Zahlen sind je 1 g Frischsubstanz angegeben.

Die Ergebnisse der ersten Zählung sind in Tabelle I, die der zweiten in Tabelle II zusammengestellt. Die Auswertung dieser wie auch der in den folgenden Tabellen niedergelegten Zahlen erfolgt später (S. 461ff.).

Tabelle I.

Zahlen nach Plattenmethode. Bebrütung 24 Stunden bei etwa 37°.

Nr.	Pansen		Dünndarm		Abnahme P.-Dü.		Dickdarm		Zunahme Dü.-Di.
	Zahl je 1 g	Trocken-substanz	Zahl je 1 g	Trocken-substanz	Zahl	%	Zahl je 1 g	Trocken-substanz	Zahl je 1 g
1	27 837	5,9	1 897	7,3	25 940	93,2	160 710	10,2	158 813
2	27 000	6,2	2 630	—	24 370	90,3	63 375	13,0	60 745
3	3 149	6,5	424	8,5	2 725	86,5	165 147	11,9	164 723
4	14 762	6,9	2 442	7,6	12 320	83,5	293 920	14,0	291 478
5	18 875	11,6	15 362	8,2	3 513	18,6	91 862	15,1	76 500
6	4 837	11,0	400	7,4	4 437	91,7	44 250	13,8	43 850
7	10 950	6,3	685	7,0	10 265	93,7	22 280	8,2	21 595
8	8 625	8,5	3 200	4,3	5 425	62,9	109 500	11,9	106 300
9	2 524	12,6	1 662	6,5	862	34,2	24 250	15,4	22 588
10	40 337	7,2	4 575	7,4	35 762	88,7	112 120	9,3	107 545
11	64 062	6,5	31 282	7,3	32 780	51,2	60 000	9,3	28 718
12	43 675	5,9	4 650	8,0	39 025	89,4	—	—	—
13	92 137	10,5	8 000	7,5	84 137	91,3	—	—	—
14	47 430	—	4 850	8,2	42 580	89,8	—	—	—
15	15 370	15,1	—	—	—	—	—	—	—
Mittel aus 1-11	20 269	8,9	5 869	7,1	14 400	71,0	104 310	11,9	98 449

Tabelle II.

Zahlen nach Plattenmethode. Bebrütung 5 Tage bei 37°.

Nr.	Pansen Zahl je 1 g	Dünndarm Zahl je 1 g	Abnahme P.—Dü.		Dickdarm Zahl je 1 g	Zunahme Dü.—Di. Zahl je 1 g
			Zahl	%		
1	102 400	5 640	96 760	94,5	508 000	502 360
2	158 000	2 060	155 940	98,7	204 000	201 940
3	116 000	3 940	112 060	96,6	366 000	362 000
4	94 260	5 470	88 790	94,2	188 500	183 030
5	63 000	3 240	59 760	94,9	408 000	404 760
6	288 400	16 820	211 580	92,6	423 900	407 080
Mittel	137 010	6 195	130 815	95,5	349 733	343 538

Gleichzeitig mit diesen Platten wurden auch solche unter anaeroben Verhältnissen, im Anaerobenapparat nach *Maassen* (vgl. unten S. 449f.) bebrütet. Die Keimzahl war hierbei jedoch so gering, daß dieser Versuch nur dreimal wiederholt wurde, es daher keinen Zweck hat, die so gefundenen Werte anzuführen, und sich außerdem herausstellte, daß die direkte Zählung zum Ziele führte.

2. Verdünnungsverfahren.

Es wurden hierbei zu 9 ccm Bouillon je 1 ccm des Materials gegeben und so Verdünnungen bis 10^{12} hergestellt. Dabei wurde zwischen zwei beimpften Röhrchen je ein Röhrchen mit sterilem Wasser beimpft, um die Sterilität der benutzten Pipette zu prüfen, die vor jeder Weiterimpfung in siedendem Alkohol sterilisiert wurde. Das letzte Röhrchen einer Verdünnungsreihe, das noch Wachstum durch Trübung anzeigt, gibt die Keimzahl an, da es mindestens mit einer Zelle beimpft worden sein muß.

Tabelle III zeigt das Ergebnis.

Tabelle III.

Verdünnung	1:100	1:1000	1:10000	1:100000	1:1000000	1:10000000
Pansen	+	+	+	+	—	—
Dünndarm	+	+	+	—	—	—
Dickdarm	+	+	+	+	+	+
Pansen	+	+	+	+	+	—
Dünndarm	+	+	+	+	—	—
Dickdarm	+	+	+	+	+	+

(Bebrütung: 8 Tage bei 37°. + bedeutet Wachstum.)

3. Filtrationsverfahren.

Hierbei wurde ähnlich vorgegangen wie bereits bei der Methodik, die *Schwarz* zur Bestimmung der Stickstoffverteilung im Pansen anwandte, geschildert wurde, jedoch wurden die Bakterien als Trockenmasse bestimmt.

Um möglichst alle Bakterien, die sich an den Futterteilen festgesetzt hatten bzw. in die Pflanzenzellen eingedrungen waren, in die Lösung zu bekommen, wurde eine größere Menge des Materials in einem geräumigen Kolben mit einer genügenden Menge sterilen Wassers versetzt, einige Glaskugeln hinzugefügt und etwa 10 Minuten kräftig geschüttelt. Nachdem sich die Futterteilchen am Boden der Gefäße abgesetzt hatten, wurde die überstehende, bakterienhaltige Flüssigkeit vorsichtig abgesaugt. Um eine Vermehrung der Bakterien zu verhindern, wurde zu 100 ccm Flüssigkeit 1 ccm Formalin hinzugefügt.

Der Bodensatz in den Schüttelgefäßen wurde nun so lange auf die gleiche Art behandelt, bis er praktisch frei von Bakterien war. Bei der mikroskopischen Kontrolle wurde allerdings festgestellt, daß die in die Pflanzenzellen eingedrungenen Kokken auch bei längerer Behandlung des Materials nicht vollständig herausgeschwemmt werden konnten.

Nach dem Schütteln klären sich die Flüssigkeiten in der Reihenfolge: Dünndarm—Pansen—Dickdarm. Als Bodensatz bleiben in allen Kolben sehr hell und sauber aussehende Strohteilchen zurück, die sich nur durch ihren Zerkleinerungsgrad unterscheiden.

Die durch Ausschütteln gewonnene Bakteriensuspension enthält noch Futterteilchen, die entfernt werden müssen. Filtrieren durch eine Nutsche mit Papiereinlage war nicht möglich, da sich das Filter sofort verstopfte. Es wurde daher für die Nutsche eine Einlage angefertigt, die aus zwei Stoffscheiben bestand, zwischen die eine Schicht Zellstoff gelegt wurde. Durch dieses Filter ließen sich die Flüssigkeiten absaugen, wobei die meisten Bakterien ohne weiteres hindurchliefen, während der größte Teil der Futterreste zurückgehalten wurde. Um die Bakterien, die noch im Filter verblieben waren, herauszuschwemmen, wurde dieses, wieder unter Zugabe von Glaskugeln, im Kolben mehrfach kräftig ausgeschüttelt. Nach dem Absitzenlassen wurde durch ein einfaches Papierfilter filtriert, das durch Auswaschen möglichst restlos von Bakterien befreit wurde.

Von den so erhaltenen Flüssigkeiten, die praktisch alle Bakterien enthielten, wurden je 250 ccm durch ein Membranfilter mit 0,75 μ Porenweite abgesaugt. Der Rückstand wurde getrocknet und gewogen.

Das Ergebnis dieses Versuches ist in der Tabelle IV zusammengestellt.

Tabelle IV.

	Ausgangsmengen	Flüssigkeitsmengen nach Ausschütteln
Pansen	20,6240 g	2180 ccm
Dünndarm	21,3734 g	1290 „
Dickdarm	23,9015 g	2310 „
		hiervon je 250 ccm abfiltriert

	Trockensubstanz in % der Frischsubstanz	Trockenrückstand der Ausschüttelung		Trockensubstanz besteht aus % Rückstand
		in g je 250 ccm	in % der frischen Substanz (= Bakterien)	
Pansen	14,0	0,0589	*2,4904*	17,796
Dünndarm	9,8	0,1220	*2,9454*	29,976
Dickdarm	11,5	0,0788	*3,0430*	26,403

Die Zahlen für die Trockenmasse an „Bakterien" je 100 g frischen Darminhaltes sind *kursiv* gesetzt.

4. Zentrifugierverfahren.

Dieses Verfahren wurde von *Strassburger* ausgearbeitet und zur gewichtsmäßigen Bestimmung der Bakterienmengen in der menschlichen Faeces benutzt. Es beruht auf rein mechanischer Trennung der Bakterien von den übrigen Bestandteilen; ich ging in ähnlicher Weise vor.

Versuch I. Eine größere Menge des Materials wurde in einem geräumigen Kolben mit der fünf- bis zehnfachen Menge Wasser versetzt und so lange kräftig durchgeschüttelt, bis eine gleichmäßige Verteilung erreicht war. Von diesen Aufschwemmungen wurden je 20 ccm in die Gläschen der Zentrifuge gefüllt. (Die gewichtsmäßige Menge geht aus Tabelle V hervor. Bei Verwendung von 40 oder 50 ccm werden die Flüssigkeitsmengen im Verlauf des Versuchs zu groß.) Nach Auffüllen der Gläschen mit Wasser wurde der Inhalt kräftig durchgeschüttelt und 3 Minuten bei 1000—1200 Touren zentrifugiert. Nach Absaugen der überstehenden Flüssigkeit wurde der Bodensatz acht- bis zehnmal in der gleichen Art behandelt und war dann frei von Bakterien (Abb. 1). Die so erhaltenen Bakterienaufschwemmungen (250—400 ccm) wurden in Portionen je 5 Minuten bei 1500 Touren zentrifugiert, da sich in dieser noch kleine Futterteilchen befanden. Unter dem Mikroskop

Abb. 1. Präparat aus dem Bodensatz nach Abzentrifugieren bei niedriger Tourenzahl. (Vergr. 480fach)

konnten solche danach nur noch vereinzelt gefunden werden, wenn ein Präparat direkt aus den überstehenden Bakteriensuspensionen hergestellt wurde.

Der nach dem Zentrifugieren der gesammelten Flüssigkeiten anfallende Bodensatz enthielt noch Bakterien. Er wurde daher drei- bis viermal kräftig aufgeschüttelt, 5 Minuten bei 1500 Touren zentrifugiert und enthielt danach keine Bakterien mehr.

Strassburger versetzt die so erhaltene Bakteriensuspension mit der gleichen Menge Alkohol und dampft auf dem Wasserbad auf etwa 40 ccm ein. Hieraus werden die Bakterien dann abzentrifugiert. Bei den vorliegenden Versuchen wurde jedoch so verfahren, daß die gesammelten Flüssigkeiten durch ein Membranfilter (0,75 μ Porenweite) abgesaugt und der Rückstand nach dem Trocknen als Bakterien gewogen wurde.

Versuch II. Vor dem eigentlichen Zentrifugieren wurde je ein Röhrchen mit Inhalt aus dem Pansen, Dünndarm und Dickdarm mit Äther versetzt, kräftig durchgeschüttelt und 10 Minuten bei 1800—2000 Touren zentrifugiert. Die überstehende ätherische Schicht erwies sich als frei von Bakterien, war absolut klar und mehr oder weniger gelblich gefärbt. Es sollte auf diese Art möglicherweise vorhandenes Fett entfernt werden. Nach dem Verdunsten des Äthers blieb eine völlig strukturlose undefinierbare, etwas gelblich gefärbte Masse zurück. Das Material in den Zentrifugengläschen wurde danach genau wie im ersten Versuch behandelt.

Das Ergebnis dieser beiden Versuche findet sich in Tabelle V.

Tabelle V.

	20 ccm enthielten Frischsubstanz in g	Gewicht des trockenen Rückstandes			Trockensubstanz	100 g Trockensubstanz enthalten Rückstand in g	
		gefunden in g	Mittel	In 100 g Frischsubstanz (= Bakterien)			
				Versuch I.			
Pansen	3,362	0,0154					
	3,362	0,0174	0,0164	*0,4878*	8,8	5,543	
Dünndarm	1,802	0,0224					
	1,802	0,0212	0,0218	*1,1990*	6,6	18,16	
Dickdarm	1,818	0,0330					
	1,818	0,0330	0,0330	*1,8150*	13,9	13,06	
				Versuch II.			
Pansen	1,818	0,0146		*0,803*		5,948	
	1,818	0,0136		*0,748*	13,5	5,541	Entfettet
Dünndarm	1,818	0,0282		*1,551*		16,43	
	1,818	0,0090		*0,495*	9,4	4,767	Entfettet
Dickdarm	1,818	0,0290		*1,595*		9,882	
	1,818	0,0234		*1,287*	17,0	7,571	Entfettet

Die Zahlen für die Trockenmasse an „Bakterien" je 100 g frischen Darminhaltes sind *kursiv* gesetzt.

5. Direkte Zählung.

Eine unmittelbare Auszählung der Bakterien in dem zur Untersuchung gelangten Material war ohne weiteres nicht möglich. Die

Bakterien haften, teilweise in großen Verbänden, an den Futterteilen, während andere einzeln oder ebenfalls in Verbänden frei umherschwimmen. Wenn alle erfaßt werden sollen, so müssen sie einmal möglichst restlos von den Futterteilen gelöst, zum anderen müssen die Zellverbände aufgelockert werden; schließlich ist eine Entfernung der Futterteile selbst erforderlich, damit bei der Zählung keine Bakterien verdeckt werden.

Dieses wurde erreicht durch kräftiges und anhaltendes Schütteln des Materials, nachdem es mit Wasser vermischt war, und durch nicht allzustarkes Zentrifugieren (bei Tourenzahl 800—1000), wobei der entstehende Bodensatz so lange behandelt wurde, bis er frei von Bakterien war. Dieses gelingt praktisch vollständig, jedoch werden auch hier, wie bereits auf S. 436 erwähnt wurde, die Kokken, die sich in den Pflanzenzellen des Futters befinden, nicht restlos mit erfaßt.

Präparate, aus den so erhaltenen Flüssigkeiten hergestellt, können zur Auszählung der Bakterien nicht verwendet werden, da die Zahl je Gesichtsfeld viel zu gering ist. Die Flüssigkeiten wurden daher wieder durch ein Membranfilter filtriert, der Rückstand quantitativ in einen Kolben überführt und mit einer bestimmten Menge Wasser aufgefüllt. Nach sehr sorgfältigem Durchmischen dieser Bakterienaufschwemmung, die nun allerdings auch noch kleinste Futterpartikelchen enthielt, wurden hieraus die Zählpräparate hergestellt. Bei der Herstellung der Präparate ergaben sich noch einige Schwierigkeiten, die kurz erwähnt werden müssen.

Das gleichmäßige Ausstreichen der Bakterienaufschwemmung auf Deckgläschen war äußerst schwierig, da die Deckgläser, auch nach Einlegen in Alkohol und Abflammen, nicht fettfrei waren. Das Entfetten der Gläser wurde in vollem Umfange nach dem Verfahren von *Peppler* erreicht. (Kochen eine halbe Stunde in 4%iger $KMnO_4$-Lösung. Gut abspülen. Kochen eine halbe Stunde in HCl 1 : 4. Gut spülen. Aufheben in Alkohol und vor Gebrauch Abflammen.) Auf den so vorbereiteten Deckgläschen ließ sich die Bakterienaufschwemmung mit einer rechtwinklig abgebogenen Platinnadel völlig gleichmäßig ausstreichen.

Eine weitere Schwierigkeit entstand dadurch, daß sich beim Färben der Präparate die Bakterien nicht gleichmäßig anfärbten und zum Teil keinen Farbstoff aufnahmen. Das von *A. Klein* (1) empfohlene Anilinwasser-Gentianaviolett färbt zwar sehr schnell und kräftig, scheidet aber leicht kleinste Tröpfchen aus, die beim Zählen möglicherweise mit einzelnen Kokken verwechselt werden können. Von den gebräuchlichen Farbstoffen erwies sich Carbolfuchsin, vor Gebrauch frisch filtriert, als gut geeignet. Eine kleine Menge wurde in ein Schälchen filtriert und das ganze Präparat 3—8 Minuten eingelegt. Danach waren sämtliche Bakterien gut und kräftig gefärbt.

Ein Versuch, die Schwierigkeiten der Färbung durch Auszählung der Präparate im Dunkelfeld zu umgehen, schlug völlig fehl. Die Futterteilchen, die das Präparat ja immer noch enthielt, überstrahlten die Bakterienzellen so stark, daß sie kaum noch zu erkennen waren.

Von der Bakterienaufschwemmung wurde nun $^1/_{100}$ ccm völlig gleichmäßig auf Deckgläschen ausgestrichen, nach dem Trocknen fixiert und mit Carbolfuchsin gefärbt. Auf diese Art wurden je zehn Präparate aus dem Pansen, Dünndarm und Dickdarminhalt angefertigt. Sie wurden ausgezählt unter dem Mikroskop mit Hilfe eines Okularnetzmikrometers (nach Zeiss) und Okular 12×, Objektiv 60×, Tubuslänge 160 mm, und zwar in

jedem Präparat eine Fläche von 30 × 2700 μ^2. Besonderer Wert wurde darauf gelegt, daß an allen Stellen des Präparates Zählungen vorgenommen wurden. Beim Verschieben der Präparate wurde nicht durch das Mikroskop gesehen, ferner erfolgte die Umrechnung für 1 g Inhalt erst nach Durchführung sämtlicher Zählungen, hier also nach Untersuchung drei verschiedener Tiere. Es sollte dadurch jede Beeinflussung bei der Zählung ausgeschaltet werden.

Trotz der geschilderten Vorbehandlung des Materials befanden sich in den Präparaten, auch nach Entfettung der Substanz vor dem Zentrifugieren, noch allerlei undefinierbare Gebilde, unter denen sich winzig kleine, punktförmige als störend erwiesen, da sie mit kleinsten Kokken verwechselt werden konnten. Die Zählung wurde daher so durchgeführt, daß die Stäbchen von den übrigen Bakterien getrennt gezählt wurden. In der Tabelle VI sind die Stäbchen unter A, die Kokken, Streptokokken, Sarzinen usw. einschließlich der Stäbchen unter B aufgeführt. Bei Zellverbänden wurde jede Zelle einzeln gezählt. Eine Mikroaufnahme eines Zählpräparates zeigt Abb. 2.

Tabelle VI.

Zahlen in Millionen. 1 A, 2 A, 3 A Zahlen der Stäbchen; 1 B, 2 B, 3 B. Gesamtzahl der Bakterien (Kokken und Stäbchen).

Nr.	Pansen Zahl je 1 g*	Dünndarm Zahl je 1 g*	Abnahme P.—Dü.		Dickdarm Zahl je 1 g*	Zunahme Dü.—Di.
			Zahl	%		
1 A	1 566,8	441,6	1 125,2	71,8	2 008,8	1 567,2
2 A	1 880,0	157,7	1 722,3	91,6	1 671,0	1 513,3
3 A	3 675,0	332,8	3 342,2	90,0	4 954,0	4 621,0
Mittel	2 373,9	310,7	2 063,2	86,9	2 877,9	2 567,2
1 B	9 498,4	1 685,6	7 812,8	82,2	6 124,8	4 567,2
2 B	9,662,0	450,3	9 211,7	95,3	11 278,0	10 827,7
3 B	19 780,0	1 958,8	17 821,2	91,0	19 525,0	17 566,2
Mittel	12 980,1	1 364,9	11 615,2	89,5	12 309,3	10 987,0

* Auf frischen Inhalt bezogen.

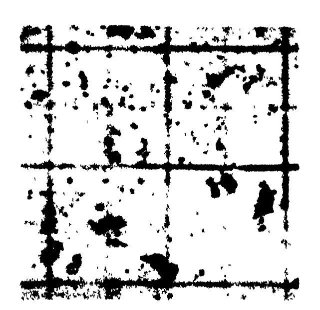


Abb. 2. Zählpräparat mit Okularnetzmikrometer nach Zeiss. Die größeren unregelmäßigen Gebilde sind Futterreste. (Vergr. 440fach.)

Aus der Tabelle VI ist zu ersehen, daß sich in den Darmabschnitten weitaus mehr Kokken als Stäbchen befinden. *Ankersmit* stellte bei seinen Untersuchungen bereits fest, daß sich in den Verdauungsorganen der Rinder außerordentlich viel Kokken befanden. Er schätzt die Zahl der Kokken auf 80—90 %.

Bei der Bestimmung der Bakterienzahlen nach der Plattenmethode (Tabelle II, S. 435) wurden, wie bei der direkten Zählung, die Kokken von den Stäbchen getrennt gezählt. In der Tabelle VII ist das

Verhältnis der Stäbchen zu den Kokken angegeben, das nach der Plattenmethode auf Grund der entstandenen Kolonien bestimmt wurde, während die entsprechenden Zahlen für die direkte Zählung in Klammern angeführt sind. Das nach den beiden Methoden gefundene Verhältnis stimmt, wie man sieht, sehr gut überein. Im Dünndarm treten also die Kokken stärker zurück gegenüber den Stäbchen als in den beiden anderen Darmabschnitten.

Tabelle VII.

Stäbchen	Gesamtzahl	% Stäbchen	Verhältnis von Stäbchen : Kokken	
			Plattenzählung	direkte Zählung
		Im Pansen.		
13 700	102 400	13,4	17,9 : 82,1	(18,2 : 81,1)
30 000	158 000	19,0		
13 100	116 000	11,4		
9 560	94 260	11,3		
21 800	63 000	34,6		
40 400	288 400	17,7		
		Im Dünndarm.		
1 510	5 640	36,6	36,0 : 64,0	(26,1 : 73,9)
880	2 060	42,7		
1 540	3 940	39,1		
1 430	5 470	24,9		
1 130	3 240	34,9		
6 420	16 820	38,2		
		Im Dickdarm.		
113 000	508 000	22,2	29,7 : 70,3	(24,3 : 75,5)
90 000	204 000	44,1		
162 000	366 000	44,3		
64 500	188 500	34,2		
64 000	408 000	15,7		
74 900	423 900	17,7		

Aus diesen Zahlen geht weiter hervor, daß die Bakterienzahl im Dünndarm ein Minimum besitzt (dessen genaue Lage im übrigen noch durch Vergleich der einzelnen Abschnitte des Dünndarms festzustellen wäre) und nach dem Dickdarm wieder zunimmt, so daß je 1 ccm Darminhalt die Zahlen für Pansen und Dickdarm annähernd gleich sind. Die Methode der Plattenzählung ergab ein ähnliches Bild; nur war die Zunahme im Dickdarm noch stärker. Das beruht offenbar darauf, daß hier eine Reihe von leicht wachsenden, also durch das Plattenverfahren erfaßbaren Fäulnisbakterien zur Entwicklung gekommen sind, die im Pansen stärker zurücktreten.

Es sei noch betont, daß sich diese Zahlen jeweils auf 1 ccm Darminhalt beziehen, somit nichts über eine *absolute* Zu- oder Abnahme aussagen (vgl. S. 466).

Isolierung einiger Bakterienstämme aus den Verdauungsorganen von Rindern.

Untersuchungen über die Zusammensetzung der Bakterienflora in den Verdauungsorganen der Wiederkäuer liegen, wie erwähnt, von *Ankersmit* vor, der Bestimmungen im Pansen, Dünndarm und Mastdarminhalt vornahm, während sich *Kreipe* auf die Untersuchung der *Milchsäurebakterien* des Pansens beschränkte. Beide Autoren isolierten auch einige Stämme. Ferner sind die Arbeiten von *Henneberg* sowie von *W. Klein* und Mitarbeiter zu erwähnen, die die Bakterien nicht isolierten, sondern sie im mikroskopischen Präparat bei ihrer Tätigkeit im natürlichen Substrat beobachteten. *Henneberg*, der die Pansenflora an Schafen untersuchte, stellte bereits fest, daß sich bei weitem nicht alle Arten kultivieren lassen, obwohl gerade diese von besonderer Bedeutung sind. *Ankersmit* dagegen kommt zu dem Schluß, daß die durch Züchtung nicht nachweisbaren Bakterien keine bedeutende Rolle spielen, während die durch Züchtung nachweisbaren in verhältnismäßig geringer Zahl vorhanden sind und vermutlich mit dem Futter in den Pansen gelangten. Weitere Literatur bei *Mangold* (S. 322ff.) und bei *Löhnis* (S. 70, 427).

Eigene Versuche.

Da die Bestimmung der unter normalen Verhältnissen vorkommenden Bakterien bereits durch *Ankersmit* und *Kreipe* erfolgte, wurden solche im Verlauf dieser Arbeit nicht durchgeführt. Es wurde lediglich eine Anzahl von Stämmen zwecks physiologischer Untersuchung isoliert.

Zur Untersuchung der Eiweißbildung der in den Verdauungsorganen vorhandenen Bakterien wurden von den zur Zählung benutzten Platten Isolierungen vorgenommen, wobei nur solche Kolonien in Frage kamen, die regelmäßig auftraten. Es sollte hierdurch erreicht werden, daß nur Stämme untersucht wurden, die zur normalen Flora gehörten. Bei der Durchmusterung der isolierten Stämme stellte es sich heraus, daß auf den Schrägröhrchen nur Stäbchen zum Wachstum gekommen waren. Es handelt sich hierbei um 30 Stämme, von denen wahrscheinlich einige untereinander identisch sind. Sie bilden Sporen und haben eine Größe von durchschnittlich $2{,}5 \times 0{,}4$ und $3{,}8 \times 1{,}0\ \mu$.

Da nicht nur die Stäbchen, sondern auch einige Stämme der zahlreich vorhandenen Kokken und Streptokokken auf ihre Eiweißbildung untersucht werden sollten, war es wünschenswert, auch hiervon einige zu kultivieren. Während jedoch die auf den Platten gewachsenen Kolonien der Stäbchen ohne weiteres auf Schrägröhrchen abgeimpft werden konnten, gelang dieses in keinem Falle mit den Kokken und Streptokokken. Diese wuchsen auf den Platten unter der Nährbodenoberfläche in sehr kleinen, undurchsichtigen, runden bis linsenförmigen Kolonien, kamen aber in keinem Falle an die Oberfläche des Agars. Besonders häufig traten hier gewisse Streptokokken auf, die auch im Präparat aus den Inhalten der Verdauungsorgane als Ketten von 6 bis

30 Gliedern (Abb. 3) sehr auffällig waren. Zur Isolierung dieser Bakterien wurden Versuche angestellt, die, obwohl sie ergebnislos verliefen, doch erwähnt werden sollen.

Wie schon erwähnt, wuchsen die Kokken und Streptokokken nicht auf Bouillon-Agar-Schrägröhrchen. Um festzustellen, ob auf anders zusammengesetzten Nährböden Wachstum eintrat, wurden Versuche mit folgenden Nährböden angestellt: Dextroseagar + 5 % Pansenextrakt. — Reiner Pansenextrakt + 1,5 % Agar. — Gemisch aus Dextroseagar und Bouillonagar 1 : 1. — Dextroseagar + 25 % Hefeextrakt. — Bouillongelatine. — Magermilch. — Acetatagar (p_H 6,3). — Blutagar.

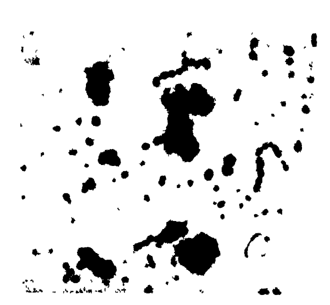


Abb. 3. Kokken aus Panseninhalt, die sich auf den angegebenen Nährböden nicht züchten ließen. (Vergr. 680 fach.)

Diese Nährböden wurden normal durch Ausstreichen und durch Stiche beimpft. Hierbei kamen auf dem durch Ausstrich beimpften Dextrose-Bouillonagar 1 : 1 in den Röhrchen auf der Oberfläche vereinzelte kleine Kolonien von etwa 1—2 mm Durchmesser zum Wachstum, die auch nach 14tägiger Bebrütung nicht größer wurden. Weiterimpfungen gelangen in einzelnen Fällen ein- bis zweimal, während nach der dritten Überimpfung kein Wachstum mehr eintrat. Bei den Stichen in Dextrose-Bouillonagar 1 : 1 war das Wachstum, wenn überhaupt solches eintrat, ebenfalls sehr schwach. Weiterimpfungen gelangen ein- bis zweimal.

Etwas reichlichere Kolonien traten auf, wenn die beimpfte Agaroberfläche mit flüssigem Nährboden übergossen wurde. Hier wuchsen teilweise 10—15 Kolonien aus. Weiterimpfungen (ebenfalls durch Überschichten) hiervon waren indessen erfolglos. Noch etwas besseres Wachstum trat ein, wenn die Röhrchen mit einem Pyrogallolverschluß versehen wurden. Hier kamen teilweise 15—20 Kolonien zum Wachsen. Weiterimpfungen gelangen auch hier nur in zwei bis drei Passagen. Endlich konnte das Wachstum noch dadurch weiter gesteigert werden, daß die untere Hälfte des Röhrchens mit einer Streptokokken-Kolonie beimpft und auf die obere Hälfte *B. prodigiosum* ausgestrichen wurde. Hierbei wuchsen 20—30 Kolonien aus, die jedoch höchstens einen Durchmesser von 2 mm erreichten. Weiterimpfungen gelangen in drei bis vier Passagen.

Die bereits erwähnten Nährböden in flüssiger Form verhielten sich genau so wie die entsprechenden festen Nährböden. Auch in sehr verdünnten Lösungen trat kein wesentliches Wachstum ein.

Auf Platten unter anaeroben Verhältnissen trat kein Wachstum ein, während die Kolonien auf Fortnerplatten (*R. Meyer* und *K. Pietschmann*, S. 1546, mit *B. prodigiosum*) etwas größer als die aerob gewachsenen wurden, jedoch nach Überimpfungen auch nur zwei- bis dreimal erneut auswuchsen.

Ankersmit fand auf Gelatineplatten zahlreiche Kokkenkolonien und auf Dextroseagar in hoher Schicht ebenfalls Zellverbände von „streptokokkenähnlicher Form“, er erwähnt ferner „zur Kokkenform neigende *Güntheri-Stäbchen*“, die jedoch als *Milchsäurebakterien* identi-

fiziert wurden. Ob eine Kultivierung dieser Formen möglich war, wird nicht angegeben, *Kreipe* konnte einige Kokken und Streptokokken in Hefeextraktlösung und Magermilch zum Wachsen bringen. Es handelt sich hierbei um *Streptococcus thermophilus*, *Str. faecium* und *Betacoccus bovis*. Diese Stämme zeigten morphologisch große Unterschiede. Cellulose wurde nicht angegriffen.

Ob es sich bei den in dieser Arbeit erwähnten Kokken und Streptokokken um die von *Kreipe* angeführten Formen handelt, wurde nicht näher untersucht, da die Isolierung nicht gelang und jedenfalls keineswegs so leicht gelingt, wie es nach der Arbeit von *Kreipe* scheinen könnte. Deshalb wurde nicht nur die Eiweißbildung der isolierten Stämme, sondern auch die der gesamten Bakterienflora ermittelt, worauf noch zurückzukommen sein wird. In der hierfür benutzten Nährlösung kamen nämlich auch große Mengen von Kokken, Streptokokken und Sarzinen neben Stäbchen zum Wachstum, während Isolierungsversuche hieraus ebenfalls negativ verliefen.

Möglicherweise werden die leicht zu kultivierenden Stäbchen wenigstens zum Teil mit der Nahrung aufgenommen, wie es auch *Ankersmit* vermutet, indessen scheint es sich bei den Kokken um Bakterien zu handeln, die sich ganz auf die Verhältnisse im Tierkörper eingestellt haben. Die Annahme, daß diesen die größere Bedeutung zukommt, wird erhärtet durch die Tatsache, daß einmal weitaus mehr Kokken als Stäbchen angetroffen werden, zum anderen dadurch, daß gerade die sehr kleinen Kokken in die Pflanzenzellen des Futters eindringen und dieses bei Stäbchen in keinem Fall beobachtet werden konnte.

Cellulosezersetzer.

Nach *Henneberg* kommen für die Zersetzung der Cellulose im Pansen auch Kokken in Frage. Da diese auch im Dünn- und Dickdarm angetroffen wurden, war es von Interesse, festzustellen, ob auch in diesen Darmabschnitten Cellulose gelöst wird.

Ankersmit impfte in Nährlösung nach *Omelianski* Pansen-, Dünndarm- und Mastdarminhalt und stellte fest, daß die Cellulose in allen Kolben vergoren wurde. Er versuchte ferner, diese Bakterien zahlenmäßig zu bestimmen, indem er aus Verdünnungen impfte, wobei er in keinem Fall 10000 Cellulosezersetzer je 1 g fand. Er hält es daher nicht für wahrscheinlich, daß diese Bakterien allein für die Zersetzung der Cellulose verantwortlich sind.

Die Versuche von *Ankersmit* wurden nachgeprüft, indem die gleiche Nährlösung mit Inhalt aus dem Pansen, Dünndarm und Dickdarm beimpft wurde.

Nach einer mündlichen Mitteilung von Dozent Dr. *R. Meyer* (Assistent am Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen) tritt bei Verwendung von gewöhnlichem $CaCO_3$ zur Neutralisation eine Zersetzung der

Cellulose ein, auch wenn die Kolben nicht beimpft wurden. Die Bakterien entstammen hierbei offenbar dem $CaCO_3$. Die benutzte Nährlösung wich also insofern von der üblichen ab, als hier (nach *R. Meyer*) gefälltes $CaCO_3$ p. A. verwendet und die Luft aus den Kulturgefäßen vor dem Sterilisieren (dreimal bei 120° C) durch Evakuieren entfernt wurde.

Wie bei *Ankersmit* wurde auch hier die Cellulose in allen Kolben gelöst. Cellu...ezersetzer kommen demnach in allen Darmabschnitten vor.

Versuche zur zahlenmäßigen Bestimmung der Cellulosezersetzer. Nachdem *Ankersmit* nach dem Verdünnungsverfahren keine befriedigenden Ergebnisse erzielen konnte, wurde hier aus zerrupfter Cellulose und der Nährlösung nach *Omelianski* ein Brei hergestellt, der in Petrischalen festgestampft wurde, so daß eine ziemlich ebene Oberfläche entstand, sterilisiert, beimpft und im Anaerobenapparat aufgestellt. Die Cellulosezersetzer sollten sich dadurch anzeigen, daß an Stellen, an denen Wachstum eintrat, die Cellulose gelöst, zumindest aber verfärbt wurde. Leider trat nach wochenlanger Bebrütung kein Wachstum auf, so daß eine zahlenmäßige Bestimmung so nicht möglich war. Weitere Versuche in dieser Hinsicht wurden nicht angestellt.

Untersuchungen über Eiweißbildung durch Bakterien im Pansen-, Dünndarm- und Dickdarminhalt von Rindern.

Die ältesten Untersuchungen über die Fähigkeit der Pansenbakterien, aus stickstoffhaltigen Nährlösungen Eiweiß aufzubauen, wurden von *Müller* durchgeführt, der als Stickstoffquelle Asparagin benutzte. Es wurde festgestellt, daß die Bakterien in der Lage waren, hieraus „höher molekulare, stickstoffhaltige Verbindungen aufzubauen, die sich den gebräuchlichen Fällungsmitteln gegenüber wie Pepton und Reineiweiß verhielten". Sehr ausführliche Arbeiten über Eiweißbildung durch Bakterien liegen von *A. Rippel* vor (1 bis 4), die sich auch mit der Herstellung einer synthetischen Nährlösung befassen, aus der Glykokoll durch ein aus Dünn- und Dickdarm des Rindes isoliertes Bakterium (*Bacillus glycinophilus*) innerhalb von 48 Stunden fast quantitativ in Eiweiß übergeführt werden konnte. *Rippel* (13) führt hier auch den Begriff „Eiweißkoeffizient" ein, der gebildetes Eiweiß je 100 mg Glucoseverbrauch angibt. *Pellegrini* bestimmte den ökonomischen Koeffizienten von *Bac. silvaticus*, der von *Rippel* umgerechnet (4) z. B. einen Eiweißkoeffizienten von rund 7,5 hat.

Eigene Versuche.

Wachstum bei verschiedenen Stickstoffquellen.

Bevor die Eiweißbildung der isolierten Stämme aus einer N-haltigen Nährlösung untersucht wurde, wurde das Wachstum auf Nährböden mit verschiedenen Stickstoffquellen bestimmt.

Der verwendete Nährboden hatte folgende Zusammensetzung: Glucose: 1,0 %; K_2HPO_4: 0,1 %; $MgSO_4$: 0,02 %; NaCl: 0,02 %; p_H 7,1. Als Stickstoffquellen wurden verwendet: Ammoniumlactat/Harnstoff/Ammoniumacetat/Alanin/Ammoniumnitrat/Glykokoll. Dabei wurden die Mengen so gewählt, daß der Nährboden stets die gleiche Menge Stickstoff enthielt, während das p_H in jedem Fall auf rund 7,1 gebracht wurde.

Die Ergebnisse gehen aus der Tabelle VIII hervor; sie zeigen, daß einfache Stickstoffverbindungen recht gut verwertet werden können, selbst Nitrat, das etwa der Hälfte der geprüften Stämme als teilweise recht gute Stickstoffquelle dienen kann.

Tabelle VIII.

Wachstum der isolierten Stämme bei verschiedenen N-Quellen. Beurteilung nach 3 Tagen bei 37°. Ein — bedeutet kein Wachstum; + = sehr geringes Wachstum; ++ = mittleres Wachstum; +++ = gutes Wachstum.

Stamm Nr.	Ammonium-lactat	Harnstoff	Ammonium-acetat	Alanin	Ammonium-nitrat	Glykokoll
			Stämme aus dem Pansen.			
1	+++	++	+++	+++	+++	++
2	+++	+	+++	+++	+++	—
3	—	+++	—	++	—	+
4	—	+++	—	—	—	—
5	—	—	—	+	—	—
6	—	—	—	—	—	—
7	+++	++	++	+++	+++	—
8	+++	+++	—	++	—	++
9	+++	+++	+++	+++	++	++
10	+++	+++	+++	+++	+	++
11	+++	+++	++	+++	++	+
			Stämme aus dem Dünndarm.			
1	—	—	—	—	—	—
2	—	+	—	—	—	—
3	++	++	—	+	—	+
4	+	++	—	+	—	—
5	++	++	—	+	—	+
6	+++	+++	+++	+++	+++	++
7	+	++	—	+	—	—
8	+++	++	+++	+++	+++	+
9	+++	+++	—	+++	+++	+
			Stämme aus dem Dickdarm.			
1	++	+++	—	+	—	+
2	++	+	—	+++	—	+
3	++	++	—	+	—	+
4	+	++	—	+	—	+
5	+++	+++	+++	+++	+++	++
6	+++	+++	+++	+++	++	+
7	+++	+++	—	+++	+++	++
8	+++	+++	+++	+++	+++	++
9	—	+	—	+	+	++
10	++	+++	—	—	—	+

Bestimmung der gebildeten Eiweißmenge und des Eiweißkoeffizienten.

Eiweißbildung unter aeroben Verhältnissen.

Als Nährlösung wurde die von *Pellegrini* (17) angegebene verwendet. Sie enthielt: Glucose 1%; $FeSO_4$ 0,005%; $MgSO_4$ 0,01%; Harnstoff 0,1%; K_2HPO_4/KH_2PO_4 0,40/0,13%; Agar 0,01%; p_H rund 7. Das Eisen wurde getrennt von den übrigen Bestandteilen gelöst und dann der fertigen

Lösung hinzugefügt, ebenso wurde das Agar getrennt gelöst und der bis zum Sieden erhitzten Lösung zugegeben.

Die 200 ccm fassenden Erlenmeyerkölbchen aus Jenaer 20er Glas wurden mit 50 ccm Nährlösung beschickt, im Dampftopf sterilisiert und mit 24 Stunden alten Kulturen (auf Bouillon-Agar) vermittelst Öse beimpft. Die Bebrütung erfolgte bei 37° im Thermostaten.

Nach 3, 5 und 7 Tagen wurde die Eiweißmenge bestimmt nach der Methode von *Barnstein*, wie sie auch *Rippel* anwandte, während der noch vorhandene Glucoserest im gleichen Kolben (Filtrat) nach *Bertrand* (vgl. *Rona*, S. 144) bestimmt wurde. Bei jeder Versuchsserie wurden zwei nichtbeimpfte Kolben in der gleichen Art wie die beimpften behandelt, und nach 5 Tagen (Thermostat) auf „Eiweißstickstoff" und Zuckergehalt untersucht. Dieses erwies sich als notwendig, da der so gefundene Zuckerwert nie mit der Einwaage übereinstimmte, sondern stets niedriger war. So enthielten die Kolben anstatt 500 mg meist nur zwischen 430—480 mg Glucose. Ebenso schwankte der „Eiweißstickstoff" zwischen 0,20 und 0,35 mg. Die so für jede frisch hergestellte Nährlösung ermittelten Blindwerte wurden von den später gefundenen Werten in Abzug gebracht.

Die Ergebnisse der Eiweißbestimmungen gehen aus Tabelle IX hervor, wobei aus Gründen der Raumersparnis lediglich die Werte des gefundenen Eiweißes[1] (N × 6,25) und der Eiweißkoeffizient (auf 100 g verbrauchten Zucker gebildete Menge Eiweiß) angegeben sind. Gerade die Bestimmung des Eiweißkoeffizienten scheint wesentlich zu sein, da das Bakterieneiweiß nur dann für das Tier von einigem Nutzen sein kann, wenn seine Bildung ökonomisch erfolgt, d. h. nicht zu viel Kohlenhydrat erfordert (S. 468).

Der Eiweißkoeffizient der isolierten Stämme schwankt zwischen 13,9 und 3,1; er liegt im Mittel bei den Pansenstämmen bei 7,6, bei den Dünndarmstämmen bei 8,1 und bei den Dickdarmstämmen bei 5,7 (nach 3 Tagen). Im Mittel aus allen Stämmen liegt er bei 7,2, also einem Wert, wie ihn *Rippel* (4) für das von *Pellegrini* untersuchte sporenbildende Erdbakterium *Bac. silvaticus* errechnete. Diese Werte sind als recht hoch anzusehen, wenn auch in keinem Fall solche erreicht wurden, wie sie *Rippel* bei *Bac. glycinophilus* fand.

Aus der Tabelle geht ferner hervor, daß der nach 3 Tagen gefundene Eiweißkoeffizient in den meisten Fällen ziemlich konstant bleibt und nur bei einigen Stämmen im weiteren Verlauf etwas absinkt.

Die so gefundenen Werte lassen sich nun nicht ohne weiteres auf die Verhältnisse im Tierkörper übertragen, wie z. B. *Müller* glaubt. Die Lebensbedingungen sind hier für die Bakterien wesentlich andere, und zwar vor allem insofern, als sie hier unter Abschluß von der Außenatmosphäre arbeiten müssen. Von streng anaeroben Verhältnissen kann trotzdem wohl nicht die Rede sein, da durchaus die Möglichkeit besteht, daß im Tierkörper ein geeignetes Redoxpotential hergestellt wird.

[1] Da bei Bakterien kein Chitin vorkommt, so wird die Berechnung des Eiweiß-Stickstoffs durch diesen Stoff nicht gestört.

Tabelle IX.

Eiweißbildung in Reinkulturen der isolierten Stämme.

Stamm Nr.	Kultur-dauer	Stämme aus					
		Pansen		Dünndarm		Dickdarm	
		mg Eiweiß je Kolben	Eiweiß-koeffizient	mg Eiweiß je Kolben	Eiweiß-koeffizient	mg Eiweiß je Kolben	Eiweiß-koeffizient
1	3	11,22	13,85	nicht gewachsen		8,56	6,10
	5	15,75	11,59			9,00	6,09
	7	30,63	11,28			9,31	5,93
2	3	7,19	9,30	2,84	8,24	nicht gewachsen	
	5	8,09	6,36	3,34	7,32		
	7	12,13	4,73	3,42	6,87		
3	3	8,56	6,53	9,44	7,49	7,63	5,59
	5	8,62	5,98	10,15	6,98	8,03	5,44
	7	9,31	5,74	10,75	7,12	10,00	5,62
4	3	10,32	4,84	7,63	5,59	8,09	5,89
	5	17,06	4,84	9,50	6,35	10,37	6,50
	7	19,31	4,85	10,34	5,87	11,62	6,46
5	3	nicht gewachsen		8,12	5,42	7,62	4,84
	5			9,06	5,50	9,25	3,23
	7			9,44	5,67	9,87	3,08
6	3	nicht gewachsen		7,03	12,78	8,53	4,18
	5			17,25	10,05	19,00	4,84
	7			28,40	11,60	19,68	4,37
7	3	4,34	10,94	9,00	8,28	12,12	4,01
	5	26,99	8,58	13,94	9,21	14,37	3,66
	7	29,71	6,42	22,50	8,39	15,62	3,64
8	3	25,81	5,72	6,78	6,79	16,18	8,51
	5	25,81	5,72	10,31	4,83	28,04	7,15
	7	25,62	5,65	13,97	5,27	31,06	7,70
9	3	8,62	7,93	9,44	10,25	nicht gewachsen	
	5	10,25	6,22	20,74	9,23		
	7	12,62	6,16	35,56	9,15		
10	3	11,81	4,50	—		11,19	6,89
	5	13,00	3,42			11,62	7,04
	7	13,50	3,42			11,94	6,99
11	3	14,54	5,38	—		—	
	5	17,00	4,84				
	7	17,68	4,83				

In der Tabelle sind Mittelwerte aus zwei gut übereinstimmenden Versuchen angegeben, aus Raumersparnis sind auch nur die entscheidenden Werte aufgeführt.

Eiweißbildung unter verminderter Sauerstoffspannung.

Es war jedenfalls von besonderem Interesse zu prüfen, ob die Bakterien des Pansens auch in der Lage sind, unter mehr oder weniger strengem Abschluß vom Sauerstoff Eiweiß aus einer stickstoffhaltigen

Nährlösung aufzubauen. Bei diesen Versuchen sollte weiterhin mit einer Impfung aus Darminhalt gearbeitet werden, wobei, wie oben erwähnt wurde, auch die Kokken zur Entwicklung kamen (Tabelle X).

Tabelle X.
Harnstoffnährlösung + 0,1 % Agar.

	mg Eiweiß-N je Kolben	Mittel	mg Eiweiß je Kolben	mg verbrauchte Glucose	Mittel	Eiweiß-koeffizient	% von aerob
			A. Aerobe Verhältnisse.				
			Tier Nr. 1.				
Pansen	2,30			308,25			
	2,16	2,23	13,44	304,5	306,3	4,39	
Dünndarm	4,75			431,25			
	5,05	4,90	30,63	434,55	432,9	7,08	
Dickdarm	2,01			397,5			
	1,87	1,94	12,13	400,75	396,4	3,06	
			Tier Nr. 2.				
Pansen	2,30			387,75			
	2,45	2,37	14,85	382,5	380,6	3,90	
Dünndarm	2,74			297,0			
	3,03	2,88	18,03	304,5	302,5	5,98	
Dickdarm	2,59			416,1			
	2,16	2,37	14,85	408,7	412,4	3,59	
			B. Bei Sauerstoffmangel.				
			Tier Nr. 1.				
Pansen	3,30			289,5			
	2,74	3,02	18,86	289,5	289,5	6,52	+ 48,5 %
Dünndarm	3,35			396,2			
	3,35	3,35	20,94	396,2	396,2	5,29	– 25,3 %
Dickdarm	3,35			408,7			
	3,35	3,35	20,94	401,3	405,0	4,66	+ 52,3 %
			Tier Nr. 2.				
Pansen	3,88			372,75			
	3,03	3,45	21,6	378,75	375,7	5,75	+ 47,4 %
Dünndarm	3,17			378,75			
	2,88	3,02	18,9	368,25	373,7	5,06	– 15,2 %
Dickdarm	2,59			304,5			
	2,45	2,25	15,25	289,5	297,0	4,08	+ 13,6 %

Für diese Versuche wurde die bereits angegebene Nährlösung verwendet. Die Beimpfung der Kolben erfolgte jedoch nicht mit Reinkulturen, sondern mit einer Öse Inhalt aus dem Pansen, Dünndarm und Dickdarm direkt. Kulturdauer 3 Tage.

Ein Teil der so beimpften Kolben wurde bei 37° C Thermostaten aufbewahrt, während die anderen in einem Anaerobenapparat nach *Maassen* (*R. Meyer* und *K. Pietschmann*, S. 1530) untergebracht wurden. Vor der

Beimpfung dieser Kolben wurde die Nährlösung durch einmaliges, kräftiges Evakuieren von der darin befindlichen Luft befreit.

Nach der Beimpfung wurden die Anaerobenapparate dreimal bis 18 mm Hg evakuiert und jedesmal mit Wasserstoff bis zum Ausgleich mit dem Atmosphärendruck gefüllt.

Bei der Aufstellung der Apparate bei 37° mußte allerdings der eine Hahn der Gefäße, vor den ein etwa 10 cm langes Wattefilter vorgeschaltet war, geöffnet werden, um zu verhindern, daß ein Überdruck durch Ausdehnung des Wasserstoffs entstand. Durch Diffusion und Abkühlung bestand also die Möglichkeit, daß Luft eingesogen wurde. In welchem Ausmaße dieses erfolgte, konnte im einzelnen nicht festgestellt werden, jedenfalls enthielten die Apparate nach 3 Tagen anscheinend eine gewisse Menge Sauerstoff, da Knallgas nachgewiesen werden konnte. Immerhin arbeiteten die Bakterien hier nicht unter streng aeroben Verhältnissen.

Bei den Ergebnissen in der Tabelle X ist zu berücksichtigen, daß die Kolben, die Proben desselben Tieres enthielten (es wurden zwei Tiere untersucht), auch im gleichen Apparat aufbewahrt wurden.

In einem zweiten Versuch (Tabelle XI) wurde der oben erwähnte Übelstand des Eindringens von Sauerstoff dadurch vermieden, daß der geöffnete Hahn des Anaerobenapparates nach dessen dreimaliger Evakuierung auf 14 mm Füllung mit Wasserstoff und anschließender Wasserstoffdurchspülung (15 Minuten) mit einem in Wasser eintauchenden Glasrohr verbunden wurde, das als Sperrflüssigkeit das Eindringen von Luft verhinderte. Außerdem waren Verbindungsschläuche, Gummistopfen und Dichtungsflächen mit Paraffin überzogen, so daß hier tatsächlich weitgehend anaerobe Verhältnisse herrschten.

Tabelle XI.

	mg Eiweiß-N je Kolben	Mittel	mg Eiweiß je Kolben	mg verbrauchte Glucose	Mittel	Eiweiß-koeffizient	% von aerob
A. Aerobe Verhältnisse.							
Pansen	2,73			210,0			
	2,88	2,81	17,53	214,5	212,5	8,25	
Dünndarm	2,44			180,0			
	2,73	2,58	16,125	195,0	187,5	8,60	
Dickdarm	2,88			214,5			
	3,02	2,95	18,44	247,5	231,0	7,98	
B. Anaerobe Verhältnisse.							
Pansen	2,16			163,5			
	2,02	2,09	13,06	163,5	163,5	7,99	− 3,2 %
Dünndarm	1,73			163,0			
	1,58	1,65	10,313	148,5	155,5	6,63	− 22,9 %
Dickdarm	2,16			171,0			
	2,16	2,16	13,500	171,0	171,0	7,89	− 1,1 %

Das Überraschende bei diesen Versuchen der Tabellen X und XI ist nun, daß auch unter anaeroben Verhältnissen eine Eiweißbildung stattfindet, die sich sowohl in der absoluten Höhe wie in der Ökonomie nicht wesentlich von der unter aeroben unterscheidet. Es sei nochmals das Mittel zusammengestellt:

	mg Eiweißstickstoff		Eiweißkoeffizient	
	aerob	anaerob	aerob	anaerob
Versuch 1 (Tabelle X)	17,32	19,41	4,67	5,23
„ 2 (Tabelle XI)	17,35	12,29	8,28	7,50

Ob dabei im Versuch 2 die besonders strengen anaeroben Verhältnisse für die hier im Vergleich zu den aeroben Zahlen etwas geringeren Werte verantwortlich zu machen sind, mag dahingestellt sein. Jedenfalls ist auch in diesem Falle die Ökonomie annähernd gleich.

Auffallend ist noch, daß die Dünndarmbakterien in Versuch 1 (Tabelle X) einen deutlichen Abfall der Ökonomie zeigen von aerob verglichen mit anaerob, die Pansen- und in geringerem Maße die Dickdarmbakterien hingegen ein Ansteigen[1]. In Versuch 2 (Tabelle XI) bleiben die ökonomischen Werte für diese beiden gleich, während sie für die Dünndarmbakterien ebenfalls abgesunken sind[1]. Diese Erscheinung läßt sich offenbar mit der verschiedenen Zusammensetzung der Mikroflora erklären, wenn hier auch naturgemäß genauere Einzelheiten nicht zu ersehen sind.

Erwähnt sei noch, daß in diesen Versuchen die Kokken, Streptokokken und Sarzinen, die wie erwähnt neben den Stäbchen auftraten, zahlenmäßig etwa in dem Verhältnis zueinander standen wie in dem normalen Darminhalt. Ferner trat in Versuch 1 bei den anaeroben Kulturen eine trübrot gefärbte Kahmhaut auf.

Diese Ergebnisse erhalten eine weitere Bestätigung durch Eiweißbestimmungen an anaeroben Cellulosezersetzern. Hierzu wurden Kulturen von Herrn Dr. *R. Meyer* verwendet: Rollflaschen, in denen eine anorganische Nährlösung mit Ammonphosphat als N-Quelle und Cellulose als Kohlenstoffquelle so eingefüllt war, daß nur eine sehr geringe Menge Luft über der Flüssigkeit stand; anaerober Verschluß, Beimpfung mit Reinkultur des aus Pansen isolierten anaeroben Cellulosezersetzers. Eine 4 Wochen alte Kultur ergab einen Eiweißkoeffizienten von 3,15, bezogen auf die gesamte zugegebene Menge von 2 g Cellulose. Da diese jedoch nicht völlig zersetzt war, wurde in einem Parallelversuch die Menge der unzersetzten Cellulose durch Auskochen des nach Behandeln der Kultur mit Essigsäure (zur Lösung des zugesetzten $CaCO_3$) verbliebenen Rückstandes mit Salzsäure und Lauge bestimmt, wobei sich 1,333 g Cellulose als zersetzt ergaben. Der wirkliche Eiweißkoeffizient betrug demnach 4,72. In einer 10 Monate alten Kultur, in

[1] Die Zahlen der Zu- bzw. Abnahme von aerob zu anaerob sind in den beiden Tabellen X und XI in der letzten Spalte aufgenommen, wobei die Werte von aerob = 100 gesetzt sind.

der die Cellulose ganz zersetzt war, wurde ein Eiweißkoeffizient von 7,7 gefunden.

Diese Zahlen bewegen sich also ganz im Rahmen der vorigen Feststellungen und zeigen, daß auch der anaerobe Cellulosezersetzer des Pansens unter anaeroben Verhältnissen recht ökonomisch arbeitet.

Versuche zur Ermittlung der Resorption der Nahrung in den Verdauungsorganen der Wiederkäuer.

Bei der Berechnung der Eiweißmenge, die einem Tier durch Verdauung von Bakterien zur Verfügung stehen könnte, muß die Resorption der Nahrung in den einzelnen Abschnitten der Verdauungsorgane bekannt sein (obwohl dieser Punkt unwesentlicher ist als es zunächst scheinen könnte; vgl. S. 466). Dies kann nur der Fall sein, wenn eine unveränderliche Testsubstanz vorhanden ist. Daß sich hierzu die Cellulose des Futters nicht eignet, da sie im Pansen bis zu einem gewissen Grade abgebaut wird, liegt auf der Hand. Wie es weiterhin mit der ebenfalls in dieser Hinsicht verwendeten Kieselsäure des Futters steht, wird an Hand eines Versuchs zu erörtern sein, in dem als Testsubstanz Bariumsulfat verwendet wurde. Obwohl der Versuch leider nicht zum Ziele führte, erscheint es doch wünschenswert, ihn zu schildern. Es war dabei dem Futter Bariumsulfat zugesetzt in der Annahme, daß die jeweils auf 1 g $BaSO_4$ entfallende Menge an Trockensubstanz in Futter, Pansen-, Dünn- und Dickdarminhalt den Grad der Resorption anzeigen würde.

Es wurde ein Hammel 13 Tage mit einer Ration gefüttert, die aus 300 g Haferschrot und 500 g Kleeheu bestand, wobei dem Haferschrot 10 g Bariumsulfat beigemischt waren. Diese Ration wurde immer restlos aufgenommen. Nach dem Schlachten des Tieres wurden die Bakterienzahlen nach der Plattenmethode bestimmt (Tabelle XII) und ferner die Trockensubstanzen in einzelnen Darmabschnitten ermittelt. Der *gesamte* Inhalt aus dem Pansen, Dünndarm und Dickdarm, sowie ein Teil aus dem Mastdarm, wo sich der schon ziemlich konsistente Inhalt in Ballen formt, wurden bei etwa 80° getrocknet und durch eine Mühle fein zermahlen.

Tabelle XII.

Die Bakterienzahlen je 1 g frischer Substanz in den Verdauungsorganen des Versuchshammels. Plattenmethode, Bebrütung: 5 Tage bei 37° C.

Pansen	Dünndarm	Abnahme P.—Dü.	%	Dickdarm	Zunahme Dü.—Di.
1 320 900	366 000	954 900	72,3	4 173 000	3 807 000

Ein Teil dieses Materials diente zur Bestimmung des Bariumsulfatgehaltes in den Darmabschnitten. Die Veraschung der Substanzen erfolgte ohne Zusätze nach *König*. Die Asche wurde mit verdünnter HCl erwärmt, um alle in HCl löslichen Bestandteile zu entfernen. Zurück bleibt ein Gemisch aus Kieselsäure und Bariumsulfat. Der Rückstand wurde mit $Na_2CO_3 + K_2CO_3$ aufgeschlossen, mit Sodalösung und Wasser aus-

gewaschen, in verdünnter HCl gelöst und das Barium als Sulfat mit heißer verdünnter H_2SO_4 ausgefällt, abfiltriert, getrocknet und gewogen.

In einer weiteren Menge des getrockneten Materials wurde die Kieselsäure bestimmt, und zwar nach der bei *G. Klein* angegebenen Methode.

Die Ergebnisse der Bestimmungen sind in den Tabellen XIII und XIV zusammengestellt. Bei der Berechnung sollte nun so verfahren werden, daß die Menge Eiweiß errechnet werden sollte, die, bezogen auf 1 g Bariumsulfat, dem Tier bei Verdauung von Bakterien zur Verfügung stehen würde, was sich jedoch erübrigte, da die Versuche fehlschlugen.

Wenn man die in Tabelle XIII zu 1 g Bariumsulfat gehörigen Mengen Frischsubstanz betrachtet, so erscheint das Ergebnis dieses Versuchs durchaus glaubwürdig. Berücksichtigt man jedoch die entsprechenden Trockensubstanzen, so ist aus der Tabelle zu ersehen, daß auf 1 g

Tabelle XIII.

Die in den einzelnen Darmabschnitten gefundenen Mengen $BaSO_4$.
$BaSO_4$ je 100 g Frischinhalt.

	Trockensubstanz in %	Einwaage absolute Trockensubstanz	Gefunden $BaSO_4$ in g	Gefundene Menge $BaSO_4$ in %, bezogen auf den frischen Inhalt	Mittel
Pansen	10,5	12,4181	0,0769	0,0648	
		15,6859	0,0951	0,0637	0,0642
Dünndarm	9,15	10,7132	0,1137	0,0972	
		7,1344	0,0806	0,1038	0,1003
Dickdarm	14,41	12,3519	0,3603	0,4203	
		12,8619	0,3792	0,3953	0,4078
„Kot“	45,36	9,9589	0,3631	1,6538	
(Mastdarm)		12,1262	0,4394	1,6440	1,6489

Inhaltsmengen der Verdauungsorgane bezogen auf 1 g $BaSO_4$.

	g Frischgewicht	g Trockensubstanz
Auf 1 g $BaSO_4$ entfallen im		
Pansen	1556	163,4
Dünndarm	997	91,2
Dickdarm	245	35,3
„Kot“ (Mastdarm)	60	27,2

Das Futter.

	Trockensubstanz in %	Menge in g	Trockensubstanz	$BaSO_4$
Haferschrot	87,72	300	263,16	10
Heu	88,85	500	444,25	
Zusammen:		800	707,41	10

Auf 1 g $BaSO_4$ entfallen 70,7 g Futtertrockensubstanz.

Tabelle XIV.

Die in den einzelnen Darmabschnitten gefundenen Mengen SiO_2.
SiO_2 bezogen auf 100 g trockenen Darminhalt.

	Trockensubstanz in %	Einwaage absolute Trockensubstanz	Gefunden SiO_2 in g	Gefunden SiO_2 in %, bezogen auf trockenen Darminhalt	Mittel
Pansen	10,5	10,3676 10,2276	0,1713 0,1686	1,69 1,65	1,67
Dünndarm	9,15	5,5672 9,0467	0,0698 0,1079	1,245 1,22	1,23
Dickdarm	14,41	4,8806 5,8808	0,1667 0,1987	3,379 3,415	3,39
„Kot“	45,36	7,0134 6,5560	0,2822 0,2545	4,024 3,882	3,95
Das Futter.					
Haferschrot	87,72	11,5000 9,2860	0,1675 0,1215	1,44 1,31	1,375
Heu	88,85	8,5889 9,4095	0,0500 0,0528	0,582 0,561	0,5717

Inhaltsmengen der Verdauungsorgane bezogen auf 1 g SiO_2.

	g Frischgewicht	g Trockensubstanz
Auf 1 g SiO_2 entfallen im		
Pansen	570,3	59,88
Dünndarm	888,5	81,3
Dickdarm	203,5	29,33
„Kot“	55,6	25,25

Das Futter.

	Trockensubstanz in %	SiO_2 in %	Menge in g	Trockensubstanz	SiO_2 in g
Haferschrot	87,72	1,375	300	263,16	3,619
Heu	88,85	0,572	500	444,25	2,540
Zusammen:			800	707,41	6,1586

Auf 1 g SiO_2 entfallen 114,86 g Futtertrockensubstanz.

Bariumsulfat 70,4 g Futtertrockensubstanz entfallen. Unter der Voraussetzung, daß das aufgenommene Futter restlos in den Pansen gelangt, dürften für 1 g Bariumsulfat im Pansen höchstens 70,4 g Trockensubstanz gefunden werden, wahrscheinlich aber weniger, da im Pansen bereits organische Stoffe abgebaut bzw. resorbiert sind. Wenn jedoch im Pansen 163,4 g Trockensubstanz für 1 g Bariumsulfat gefunden werden, so ist daraus zu schließen, daß das Bariumsulfat entweder mit den kleinsten Teilchen des Haferschrotes, mit dem es ja vermischt war, nur zum Teil in den Pansen gelangte, oder aber aus dem Panseninhalt

herausgespült wurde, denn auch im Dünndarm entsprechen 1 g Bariumsulfat noch 91,2 g Trockensubstanz. Dieses ist als Testsubstanz also nicht geeignet, vor allem nicht in Verbindung mit einer Futterration, die aus Heu und Haferschrot besteht, bei der die Größe der einzelnen Bestandteile sehr unterschiedlich ist. Tatsächlich konnte ich auch im Modellversuch zeigen, daß das Bariumsulfat durch Durchspülen des Futters in einem Säckchen mit Flüssigkeit teilweise ausgewaschen wird, womit also die geschilderte Erscheinung ihre Erklärung findet.

Was die Kieselsäure des Futters betrifft, so ist ein Herausspülen kaum zu erwarten. Die auf 1 g im Futter entfallende Menge Trockensubstanz (114,89 g) ist im Pansen denn auch auf 59,88 g abgesunken, was ohne weiteres mit einer Anreicherung infolge Resorption bzw. Abbaus der Futterbestandteile zu erklären wäre. Indessen findet vom Pansen zum Dünndarm wieder eine *Zunahme* auf 81,3 g statt, wie sie auch von *Wild* festgestellt wurde. Sie könnte durch eine Lösung bzw. Resorption der Kieselsäure zustande kommen, was hier aber nicht entschieden werden kann. Jedenfalls sind auch die Kieselsäurezahlen infolgedessen nicht für den gewollten Zweck brauchbar.

Daß Kieselsäure und Bariumsulfat sich hier verschieden verhalten, geht auch daraus hervor, daß im „Kot", bezogen auf Kieselsäure, 22 % der Trockensubstanz des Futters noch vorhanden sind, auf Bariumsulfat bezogen dagegen 38,5 %, also fast das Doppelte. Würden sie sich beide als Testsubstanz eignen, so müßten diese Werte natürlich gleich sein.

Auswertung der gefundenen Bakterienzahlen.

Kritik der angewandten Methoden.

Aus den Tabellen XV und XVI ist zu ersehen, daß nach jeder Methode, die zur Bestimmung der Bakterienmenge in dem zur Untersuchung gelangten Material angewandt wurde, andere Werte gefunden wurden. Eine kurze Kritik der Methoden ist daher nicht zu umgehen. Auf rein technische Fehler kann nicht eingegangen werden, jedoch

Tabelle XV.

Zusammenstellung der nach den Zählmethoden erhaltenen Werte (Mittelwerte)..

Methode	Pansen je g	Dünndarm je g	Abnahme P.—Dü.		Dickdarm je g	Zunahme Dü.—Dj. je g
			Zahl	%		
Plattenmethode I	20 269	5 869	14 400	71,0	104 310	98 449
„ II	137 010	6 195	130 815	95,5	349 733	343 538
Verdünnungsverfahren	550 000	55 000	495 000	90,0	10 Millionen	9,9 Millionen
Direkte Zählung (in Millionen)	12 980	1 364	11 615	89,5	12 309	10 987

Tabelle XVI.

100 g frischer Darminhalt enthalten g Trockenrückstand (= Bakterienmasse). Mittelwerte.

Methode	Pansen	Dünndarm	Dickdarm
Filtration	2,49	2,95	3,04
Zentrifugieren, entfettet	0,75	0,50	1,29
„ nicht entfettet	0,65	1,38	1,71

sollen kurz die Umstände erwähnt werden, die die Bestimmung der absoluten Werte verhindern.

Die Plattenmethode.

1. Es kommen nur die lebenden Bakterien zum Wachstum, denen der verwendete Nährboden und die sonstigen Bedingungen zusagen.
2. Es steht nicht in jedem Falle fest, daß eine Kolonie aus nur einer Bakterienzelle hervorgegangen ist.
3. Bei längerer Bebrütung tritt außerordentlich leicht eine vollkommene Verschleierung der Platte durch sehr schnell wachsende Kolonien ein. Diese Platten werden dadurch für die Zählung unbrauchbar.
4. Obwohl häufig eine mikroskopische Auszählung der Platten empfohlen wird, wurde in vorliegender Arbeit nur eine schwach vergrößernde Lupe verwendet. Die Verwendung des Mikroskops allein bedingt noch keine größere Genauigkeit des Ergebnisses, wenn sich auch die Zahlen wahrscheinlich erhöhen würden. Größere Genauigkeit könnte nur dann erreicht werden, wenn es gelänge, einen optisch leeren Nährboden herzustellen, da nur dann die Frage, ob ein sichtbares Gebilde eine Kolonie ist oder nicht, einwandfrei beantwortet werden kann. Es wurde daher bewußt auf eine Auszählung der Platten mit Hilfe des Mikroskops verzichtet.

Das Verdünnungsverfahren.

Hinsichtlich der Nährbodenfrage gilt hierfür das gleiche wie für die Plattenmethode Gesagte. Als weiterer Nachteil kommt hinzu, daß eine Infektionsgefahr durch das Impfen der Röhrchen mit der Pipette noch größer ist als bei der Herstellung der Platten. Selbst wenn zwischen jeder Verdünnungsstufe ein Röhrchen mit steriler Pipette und sterilem Wasser „beimpft“ wurde, kommt es vor, daß z. B. die Verdünnung 10^5 positiv ist, Verdünnung 10^6 ist negativ und Verdünnung 10^7 ist wieder positiv. Diese Erscheinung kann allerdings auch durch unregelmäßige Adsorption der Bakterien an der Pipettenwand zustande kommen. In einem solchen Falle ist es dann kaum möglich zu sagen, welches nun die richtige Bakterienzahl ist.

Beiden bisherigen Methoden gemeinsam ist der Nachteil, daß es nie gelingt, die natürlichen Lebensbedingungen der Bakterien in der künstlichen Kultur herzustellen.

Das Zentrifugierverfahren.

Dieses Verfahren beruht auf einer rein mechanischen Trennung der Bakterien von den übrigen Bestandteilen, wobei eine möglichst große

Gewichtsdifferenz zwischen Bakterien und den sonstigen Bestandteilen zu wünschen wäre. Wie bereits erwähnt, arbeitete *Strassburger* dieses Verfahren aus zur Bestimmung der Bakterienmenge in der Faeces, um Vergleiche ziehen zu können zwischen dem Bakteriengehalt bei normaler und gestörter Verdauung. Wieweit sich diese Methode hierzu eignet, kann hier nicht erörtert werden, sondern es soll hier lediglich festgestellt werden, daß diese Methode für das hier zur Untersuchung gelangte Material nicht brauchbar war, und warum dieses der Fall ist.

Der Gedanke, die Bakterien durch Zentrifugieren von den Futterresten zu trennen und gewichtsmäßig zu bestimmen, erscheint zuerst bestechend, die Schwierigkeiten häufen sich jedoch bei der Ausführung. *Strassburger* gibt selbst an, daß erst bei einiger Übung vergleichbare Werte erzielt werden, d. h. daß das Material bei jedem Versuch ganz gleichartig behandelt werden muß, und die einmal als günstig festgestellten Tourenzahlen und die Zentrifugierdauer genau eingehalten werden müssen. Der Grund dafür ist der, daß nur in diesem Falle das Verhältnis Futterpartikel : Bakterien im Ergebnis ungefähr gleich ist und nur so annähernd gleich hohe und daher vergleichbare Werte gefunden werden können. Bei peinlicher Beachtung dieser Forderungen und Untersuchung von Substanzen, die sich in ihrer Zusammensetzung nicht allzusehr unterscheiden, wird man die Ergebnisse wohl untereinander vergleichen können.

Strassburger gibt auch an, daß er bei Betrachtung des zur Wägung gelangten Zentrifugierrückstandes im Mikroskop den Eindruck gehabt habe, als hätte er eine Reinkultur von *Bact. coli* vor sich. Die im Präparat nun doch noch, wenn auch vereinzelt, sichtbaren Nahrungsbestandteile, die zwar keine Bakterien sind, aber trotzdem als solche gewogen werden, sollen als Ausgleich für die Bakterien dienen, die sich trotz Verreibens und Schüttelns des Materials noch an den Nahrungsbestandteilen befanden und daher nicht mit erfaßt wurden. Um diese Nahrungsbestandteile restlos zu entfernen, wurde eine Verdauung mit Pepsin-Salzsäure eingeschaltet. Es stellte sich jedoch heraus, daß auch ein Teil der Bakterien mit verdaut wurde.

Bei der Untersuchung verschiedener Substanzen, wie in vorliegendem Falle, kann man nun nicht so vorgehen, daß man das Material ganz gleichartig behandelt, und es läßt sich kein festes Schema dafür aufstellen, da die Zusammensetzung des Materials ganz von der verfütterten Ration abhängt. Die Behandlung muß also eine entsprechende sein. So sind die Trennungsmöglichkeiten zwischen Bakterien und sonstigen Bestandteilen besser, wenn das Tier z. B. eine Ration aus Heu oder Stroh usw. bestehend bekam, und sehr schlecht, wenn z. B. Rübenschnitzel verfüttert wurden. Im Panseninhalt liegen im allgemeinen die Verhältnisse so, daß sich die Bakterien zwischen verhältnismäßig großen Bestandteilen befinden, die Gewichtsdifferenz zwischen ihnen ist also auch groß, und eine Trennung durch Zentrifugieren daher wenigstens theoretisch nicht ausgeschlossen.

Ganz anders liegen die Verhältnisse im Dünndarm. Hier befinden sich die Bakterien zwischen sehr fein zerkleinertem Material, das außerdem bereits von Verdauungssäften angegriffen wurde. Die Trennungsmöglichkeiten sind daher sehr schlecht.

Das Material aus dem Dickdarm steht etwa zwischen dem Pansen- und Dünndarminhalt. Die äußerst kleinen Futterpartikelchen, die sich im Dünndarm befanden, sind hier zum größten Teil verschwunden, dafür ist der Zerkleinerungsgrad der Nahrung im Gegensatz zum Panseninhalt wesentlich

größer, und die Verdauung ist noch nicht beendet. Die Trennungsmöglichkeiten sind hier also besser als im Dünndarm, aber trotzdem unbefriedigend.

Nach diesen Betrachtungen muß es also möglich sein, wenigstens die Bakterien aus dem Panseninhalt herauszuzentrifugieren. Es gelang dieses auch vollständig, wie aus Abb. 1 (S. 437) ersichtlich ist.

Auch aus dem Dünn- und Dickdarminhalt konnten die Bakterien fast restlos herausgeschwemmt werden, nur enthielten die so erhaltenen Aufschwemmungen im Gegensatz zu den aus dem Panseninhalt gewonnenen außer Bakterien sehr große Mengen kleinster Futterpartikelchen. Solche befanden sich natürlich auch in der aus dem Panseninhalt erhaltenen Suspension, aber bei weitem nicht in solchem Ausmaß. Dabei zeigten die Präparate, die direkt nach dem Absaugen der über dem Bodensatz stehenden Flüssigkeit hergestellt wurden, in dieser fast nur Bakterien, während die Futterpartikelchen kaum in Erscheinung traten. In den Präparaten, die jedoch nach dem Filtrieren der gesammelten Bakteriensuspension vom Filterrückstand angefertigt wurden, der ja nun alle Teile enthielt, die größer waren als 0,75 μ, war die Zahl der Futterpartikel sehr groß.

Besonders viel undefinierbare Teilchen enthielt der aus dem Dünndarminhalt gewonnene Rückstand, während die Präparate der aus Pansen- und Dickdarminhalt erhaltenen Rückstände etwas klarer waren. Dieses geht auch besonders deutlich aus dem Versuch II in der Tabelle V hervor, bei dem der Rückstand aus dem Dünndarminhalt (bezogen auf 100 g Frischsubstanz) nach Entfettung mit Äther um rund ein Drittel geringer war als ohne Entfettung.

Es gelang in keinem Fall, die Bakterien, nachdem sie einmal in die Lösung gebracht waren, von den ebenfalls darin befindlichen kleinsten Futterpartikelchen zu trennen. Wurde zu lange und zu kräftig zentrifugiert (2000—2500 Touren), befanden sich zwar kaum noch Futterreste in der Lösung, dafür waren aber auch die meisten Bakterien mit in den Bodensatz gerissen worden, bei zu schwachem Zentrifugieren blieben die Bakterien zwar in der Lösung, ebenso aber auch die Futterteilchen. Sie müssen daher, da sie zum Teil größer sind als die Bakterienzellen, im spezifischen Gewicht von diesen verschieden sein.

Der zur Wägung gebrachte Rückstand aus dem Dünndarminhalt, beurteilt nach dem mikroskopischen Präparat, besteht gewichtsmäßig zu etwa ein Viertel aus Bakterien, während drei Viertel Futterpartikel und sonstige Bestandteile ausmachen. Der aus Pansen und Dickdarm erhaltene Rückstand mag in günstigen Fällen zu ein Drittel aus Bakterien bestehen.

Die nach der Zentrifugiermethode gefundenen Werte sind also entschieden zu hoch; eine ähnliche Kritik erfährt diese Methode auch durch *G. Klein* und *Visser*. Das läßt sich an Hand der Tabelle XVI noch weiter zeigen: Zunächst ist zu beachten, daß bei dem nichtentfetteten Material vom Pansen zum Dünndarm eine starke *Zu*nahme an Bakterienmasse erscheint, während nach den Ergebnissen meiner direkten Zählung eine *Ab*nahme auf 10,5 % erfolgt! Bei dem entfetteten Material ist der Unterschied nicht so stark, aber die geringe beobachtete Abnahme von Pansen zu Dünndarm beträgt immerhin nur so viel, daß die Bakterienmenge auf 66,7 % abgesunken ist. Ferner würde die Bakterienmasse im Pansen bei diesem Material (0,75 g je

100 g frischen Inhalts) einer Eiweißmenge von 0,38 g (Gehalt zu 50 % angenommen) entsprechen, mithin einem N-Gehalt von 0,061 g bzw. %. Wenn der Bakterien-Stickstoff rund 10 % des Gesamtstickstoffgehalts des Pansens ausmachen würde (S. 464), so müßte der Pansen demnach einen N-Gehalt von 0,61 % besessen haben, was zweifellos ebenfalls viel zu hoch ist.

Die direkte Zählung.

Die größte Genauigkeit, den Bakteriengehalt einer Substanz zu ermitteln, wird wohl durch unmittelbare Auszählung unter dem Mikroskop erreicht werden können, wobei eine sorgfältige Herstellung der Präparate vorausgesetzt wird. Wenn die Präparate direkt aus dem zu untersuchenden Material hergestellt werden können, so ist dieses für die Genauigkeit von Vorteil. Wie bereits erwähnt, konnte bei dem hier vorliegenden Material nicht so verfahren werden, sondern es war nötig, die Bakterien möglichst weitgehend von den sonstigen Bestandteilen zu trennen. Dieses gelingt in genügendem Ausmaß durch Zentrifugieren. Allerdings enthalten dann die Präparate noch Futterreste, die aber bei Auszählung unter dem Mikroskop nicht mehr stören. Sie sind jedenfalls nicht so groß, daß durch sie eine wesentliche Anzahl von Bakterien verdeckt werden kann (Abb. 2, S. 440).

Eine neue Fehlerquelle entsteht dadurch, daß einige Gebilde gewisse Ähnlichkeit mit einzelnen Kokken aufweisen und so zu Verwechslungen Anlaß geben können. Wenn man jedoch darauf bedacht ist, nur solche Zweifel erregende Gebilde als Kokken zu definieren, deren Konturen glattrandig sind und die auch in der Größe den Kokken gleichen, die im direkten Präparat aus dem Panseninhalt gefunden werden, dürfte ein allzu großer Fehler hierdurch nicht entstehen.

Nicht unerwähnt bleiben kann die Tatsache, daß bei Auszählung einer zu großen Anzahl von Präparaten und Gesichtsfeldern die Genauigkeit dadurch beeinträchtigt wird, daß sich nach längerer Zeit eine starke Ermüdung der Augen bemerkbar macht.

Das Filtrationsverfahren.

Wie aus der Tabelle IV zu ersehen ist, sind die hier gefundenen Werte völlig undiskutabel, da sie viel zu hoch sind. Die aus den Rückständen angefertigten Präparate zeigten denn auch, daß diese sehr viel Futterteilchen enthielten. Eine Stickstoffbestimmung wurde weder hier noch in den nach dem Zentrifugierverfahren erhaltenen Rückständen bzw. Bakteriensuspensionen durchgeführt, denn das Ergebnis wäre genau so falsch gewesen wie das bei Wägung der Rückstände. Bei der Stickstoffbestimmung wird ja auch der Stickstoff der Futterpartikel mit erfaßt, die sich in den bakterienhaltigen Filtraten bzw. Rückständen noch befinden, worauf schon hingewiesen wurde. Nach Filtrieren dieser Lösungen durch ein Membranfilter würden aber auch diese Futterteilchen einschließlich der Bakterien zurückgehalten werden. Der gefundene Bakterienstickstoffwert würde daher um diesen Betrag zu hoch gefunden.

Hierauf weist ja auch *Mangold* (2) hin, wie schon betont wurde. Wenn nun auch *Schwarz* und *Mangold* (2) durch eine Nutsche mit mehrfacher Papiereinlage filtrierten, so hat dieses Filter immerhin eine Porenweite von etwa 3,3—3 μ (Schleicher u. Schüll Nr. 598, 597), und die Futterteilchen, die sich im Filtrat zwischen den Bakterien befinden, haben eine

entsprechende Größe. Dabei ist eine mehrfache Papiereinlage in eine Nutsche hinsichtlich der Porenweite ohne weiteres gleichzusetzen mit einer einfachen Einlage in einen Glastrichter.

Wenn nun auch bei dem hier durchgeführten Versuch kein Papierfilter zur Trennung der Bakterien vom Futter benutzt wurde, sondern ein Filter verwendet wurde, wie es bei der Methodik bereits geschildert ist, und durch dieses Filter möglicherweise mehr Futterteilchen hindurchliefen, als es bei einem Papierfilter der Fall ist, so zeigt doch dieser Versuch, zu welchen Werten man kommen kann, wenn eine Methode nicht vollkommen einwandfrei arbeitet.

Wenn selbst beim Zentrifugieren, das hinsichtlich der Trennung der Bakterien vom Futter etwa gleichzusetzen ist mit der Trennung durch Papierfilter, die Rückstände noch sehr viel Futterteilchen enthielten, so scheint es zweifelhaft, ob der durch Mitbestimmung des Futterteilchenstickstoffs in der bakterienhaltigen Lösung gefundene zu hohe Bakterienstickstoffwert dadurch kompensiert wird, daß auf der Nutsche einige Bakterien zurückgehalten werden.

Das Filtrierverfahren ergibt also ebenfalls zu hohe Werte, und zwar in noch höherem Maße als das Zentrifugierverfahren. Denn einerseits haben wir wiederum (Tabelle XVI) eine *Zu*nahme von Pansen zu Dünndarm, während die direkte Zählung der Bakterien, wie schon erwähnt, eine *Ab*nahme auf 10,5 % erwies. Andererseits erscheinen auch die *absoluten* Zahlen *viel* zu hoch. Denn den 2,49 g Bakterienmasse im Pansen würden 1,25 g Eiweiß, somit 0,2 g bzw. % Stickstoff entsprechen. Der Pansen hätte also, bei einem Anteil des Bakterien-N von 10 % an dem Gesamt-N des Pansens 2 % Stickstoff enthalten müssen, was natürlich gänzlich unmöglich ist.

Bei meinen direkten Zählungen fand ich im Pansen rund 13 Milliarden Bakterien je 1 g frischer Masse, was, entsprechend den unten angegebenen Berechnungen einem Stickstoffgehalt von 0,104 mg entsprechen würde, bzw. würde der Bakterien-N im Pansen 0,0104 % betragen. Würde der Bakterien-N 10 % des Gesamt-N betragen, so hätte der Panseninhalt somit einen N-Gehalt von 0,1 % haben müssen, was zu der von *Schwarz* ermittelten Zahl von 0,13 % recht gut übereinstimmt. Wenn trotzdem dieser Autor sowie *Mangold* (2) den Bakterien-N des Pansens zu 10 % der Gesamtmenge mit Hilfe des Filtrierverfahrens bestimmten, also zu einem meiner direkten Zählung annähernd entsprechenden Wert kommen, andererseits aber die gewichtsmäßige Bestimmung der Bakterien bei meinen Versuchen zu ganz unmöglichen Zahlen führte, so ist das offenbar nur auf folgende Weise möglich: Entweder enthalten die Teile, die sich neben den Bakterien noch finden, nur unwesentlich Stickstoff oder der eine Fehler wird durch andere Fehler annähernd kompensiert. Auf jeden Fall aber sieht man, daß auch in dieser Methode offenbar noch Unsicherheiten stecken, die von bakteriologischen Gesichtspunkten aus eine Auswertung sehr proble-

matisch erscheinen lassen und jedenfalls weitere eingehende Untersuchungen unter bakteriologischer Kontrolle als wünschenswert erscheinen lassen.

Hierzu kommt das ganz aus dem Rahmen fallende Verhalten des Dünndarms. Hier wäre zu prüfen, ob nicht die Veränderung des Futters durch die Verdauungssäfte so wirkt, daß Bakterien und Futterteilchen nicht mehr recht zu trennen sind. Jedenfalls könnten sich auf diese Weise die eigenartigen Zahlen im Dünndarm erklären (vgl. oben, S. 464).

Die Ergebnisse der Versuche.

Nunmehr sollen auf Grund der erhaltenen Zahlen Berechnungen angestellt werden, wie hoch die dem Tier als Bakterieneiweiß zur Verfügung stehende Menge an Eiweiß ist. Hierzu müssen noch eine Reihe von Bemerkungen vorausgeschickt werden.

Bei den Ergebnissen der zahlenmäßigen Bestimmung der Bakterien (Tabellen I, II, III, VI) und auch bei den von *Ankersmit* gefundenen Zahlen sind die Schwankungen von Tier zu Tier sehr auffällig. Es ist wohl nicht anzunehmen, daß der Bakteriengehalt in den Verdauungsorganen der Wiederkäuer bei allen Tieren der gleiche ist, so daß allein hierdurch Abweichungen entstehen. Diese können jedoch besonders groß werden, wenn Proben von einem Tier entnommen werden, dessen Futterration einer Veränderung unterlag. *W. Klein* und Mitarbeiter stellten nämlich fest, daß stets eine gewisse Zeit vergeht, bis sich die Pansenflora auf eine neue Futterration eingestellt hat. Die Zusammensetzung der Flora wurde von *Klein* sogar als Maßstab für die richtige oder falsche Zusammenstellung der Futterration benutzt. Proben von einem solchen Tier entnommen können daher sehr niedrige Werte ergeben, da es durchaus denkbar ist, daß eine Reihe von Bakterien in der neuen Futterration nicht alle zum Leben notwendigen Stoffe vorfinden und daher absterben.

Aus allen Zählversuchen geht nun eindeutig hervor (auch wenn vorerst 1 g Panseninhalt = 1 g Dünndarminhalt gesetzt ist; vgl. weiter unten S. 466ff.), daß stets eine starke Abnahme der Bakterienzahl vom Pansen zum Dünndarm erfolgt. Diese beträgt bei allen Versuchen im Mittel rund 85 %. Bei *Ankersmit*, der diese Berechnung nicht durchführte, beträgt die Abnahme 86,5 und 98,4 %. Die auch hierbei auftretenden Schwankungen sind vermutlich dadurch bedingt, daß kurz vor der Schlachtung der Tiere Panseninhalt in den Dünndarm gelangte und die zur Abtötung der Bakterien notwendige Zeit nur sehr kurz bemessen war. Die Proben werden in diesem Falle zweifellos höhere Werte ergeben, da auch eine Verdauung von Bakterien noch nicht erfolgte.

Die Vermutung, daß die Abnahme der Bakterien lediglich durch Absterben im Dünndarm bedingt ist, kann für die nach der Plattenmethode gefundenen Zahlen zutreffen. Nach den Ergebnissen der direkten Zählung, bei der ja außer den lebenden auch die abgestorbenen Zellen mit erfaßt werden, findet jedoch ebenfalls eine starke Abnahme statt. Bei der Annahme, daß diese verschwundene Bakteriensubstanz verdaut ist, würde damit dem Tier eine gewisse Menge an Eiweiß zur Verfügung stehen, die sich an Hand der ermittelten Werte berechnen läßt. Im übrigen müßten natürlich auch die Inhaltstoffe der auf andere Weise absterbenden Bakterien dem Tier zufließen.

Wenn aus Bakterienzahlen die Eiweißmenge errechnet werden soll, die in den Bakterien enthalten ist, oder wenn aus einer Stickstoffbestimmung die Bakterienmenge errechnet werden soll, die diesem Stickstoffwert entspricht, so muß der Stickstoff- und Trockensubstanzgehalt der Bakterien bekannt sein.

Die Angaben darüber in der Literatur gehen sehr auseinander. So enthalten Bakterien nach *Benecke* 15,0 % Trockensubstanz, nach *Kruse* im Mittel 21,4 % Trockensubstanz und noch *Czapek* 15,8 % Trockensubstanz. Während die Trockensubstanz nach *Kruse* im Mittel aus 9,74 % Stickstoff [1] besteht, wurde der Stickstoffgehalt der Trockensubstanz von *Rippel* (4) bei einem Bakterium (*Bac. glycinophilus*) zu 8 % bestimmt. *Schwarz* berechnet den Stickstoffgehalt frischer Bakterien nach den Angaben von *Kruse* zu 2,11 %. Dieser Wert ist außerordentlich hoch und auf den entschieden zu hohen Trockensubstanzgehalt von 21,4 % zurückzuführen. Die Trockensubstanzbestimmungen wurden bei *Benecke*, *Kruse* und *Czapek* so durchgeführt, daß die Bakterien von festen Nährböden gesammelt und die Trockensubstanz dieser Masse ermittelt wurde. Nun ist der Trockensubstanzgehalt der Bakterien abhängig von dem Substrat, auf dem sie gewachsen sind, so daß der Wassergehalt bei Bakterien, die in einer Nährlösung gewachsen sind, höher ist als bei solchen, die auf einem festen Nährboden wuchsen. Da das von *Rippel* isolierte Bakterium dem Dünn- und Dickdarm des Rindes entstammt, wird im folgenden mit dem hierfür gefundenen Wert von 8 % N in der Trockensubstanz gerechnet, wobei die Trockensubstanz mit 10 % angenommen wird, da sich die Bakterien in den Verdauungsorganen der Rinder in einem sehr wasserreichen Substrat befinden. Bei einem Trockensubstanzgehalt von 15 % erhöhen sich dementsprechend die aus den Zählungen errechneten Bakterieneiweißmengen.

Ferner muß für die Berechnung der Eiweißmenge die Größe der Bakterien festgelegt werden.

[1] Vgl. Anm. 1, S. 447.

Aus der Bestimmung des Verhältnisses der Stäbchen zu den Kokken geht hervor, daß im Dünndarm der Gehalt an Stäbchen im Verhältnis zu den Kokken größer ist als im Pansen und Dickdarm. Es ist daraus zu schließen, daß die Stäbchen als Sporenbildner den Verdauungssäften im Dünndarm gegenüber widerstandsfähiger sind als die meisten Kokken. Da die Kokken im Pansen etwa 80 % der vorhandenen Bakterien ausmachen, wird durch die Annahme, daß eine Bakterienzelle den Raum von 1 μ^3 ausfüllt, ein allzu großer Fehler nicht entstehen.

Berechnung der Eiweißmenge, die dem Tier durch Verdauung von Bakterien täglich zur Verfügung steht.

Bei dieser Berechnung werden naturgemäß nur die Zahlen zugrunde gelegt, die nach der direkten Zählung (Tabelle VI) gefunden wurden, während die nach der Plattenmethode gefundenen Werte nicht berücksichtigt werden. Nach Versagen des Versuchs zur Bestimmung der Resorption in den einzelnen Darmabschnitten muß nun weiterhin zunächst 1 g Panseninhalt gleichgesetzt werden mit 1 g Dünndarminhalt.

100 g Bakterientrockensubstanz enthalten 8,0 g N. Die Bakterien enthalten 10 % Trockensubstanz. 100 g frische Bakterien enthalten 0,8 g N = 5 g Eiweiß. Eine Bakterienzelle nimmt den Raum von 1 μ^3 ein, somit enthält 1 ccm 1 Billion Bakterienzellen. 100 Billionen Bakterien = 0,8 g N = 5,0 g Eiweiß.

Nach Tabelle VI A (Stäbchen) wurden in 1 g Panseninhalt gefunden: rund 2,37 Milliarden Bakterien, in 1 g Dünndarminhalt: rund 0,31 Milliarden Bakterien. Das ergibt eine Abnahme von 2,06 Milliarden Bakterien je 1 g zwischen Pansen und Dünndarm. Nach *Gaus* sollen beim Rind täglich zwischen 30 und 60 kg Panseninhalt in den Dünndarm gelangen. Rechnet man mit einer Menge von rund 40 kg täglich, so stünden damit dem Tier nach obigen Zahlen *4,12 g* Bakterieneiweiß (aus Stäbchen) täglich zur Verfügung.

Nach Tabelle VI B (Gesamtzahl) wurden im Mittel gefunden: im Pansen rund 12,98 Milliarden Bakterien; im Dünndarm rund 1,36 Milliarden Bakterien, somit eine Abnahme von 11,62 Milliarden Bakterien. Unter gleichen Voraussetzungen wie oben ergibt sich hieraus eine Eiweißmenge von *23,24 g* täglich.

Für 100 kg Panseninhalt berechnet sich nach diesen Zahlen (12,98 Milliarden je 1 g) die Bakterieneiweißmenge zu 64,9 g. Nach den Zählungen werden hiervon 85 % im Mittel verdaut, was einer Eiweißmenge von 55,16 g entspricht.

Nach den Ergebnissen des Versuchs II in Tabelle V, des einzigen Versuchs zur gewichtsmäßigen Bestimmung der Bakterien, der insofern mit den Ergebnissen der Zählversuche übereinstimmt, als auch hier

wenigstens eine Abnahme der Bakterien vom Pansen zum Dünndarm erfolgt (vgl. oben S. 456), wurden gefunden: im Pansen je 100 g Inhalt: rund 0,75 g trockene Bakterien; im Dünndarm je 100 g Inhalt: rund 0,50 g trockene Bakterien. Unter gleichen Voraussetzungen wie oben ergibt sich daraus eine Eiweißmenge von *50,0 g* täglich. Dieser Wert müßte natürlich an und für sich zu hoch sein nach den Erfahrungen, die mit der Zentrifugiermethode gemacht wurden, stimmt aber bei Berücksichtigung dieses Umstandes nicht schlecht mit dem Ergebnis der direkten Zählung überein.

Schwarz bestimmte den Gesamtstickstoffgehalt des Pansens zu 0,13 % und den Stickstoffanteil der Bakterien daran zu 11,7 %, während *Mangold* (2) den Gesamtstickstoffgehalt zu 0,2—0,3 % und den Anteil des Bakterienstickstoffs daran zu rund 10 % bestimmte. *Mangold* untersuchte den Pansen eines Hammels und hält den von *Schwarz* gefundenen Gesamtstickstoffgehalt von 0,13 % für zu niedrig, da die von ihm untersuchten Schlachthausrinder nur mit minderwertigem Heu gefüttert waren. Dieses steht auch im Einklang mit dem Ergebnis der Untersuchung eines Pansens vom Hammel im Verlauf dieser Arbeit, bei dem der Gesamtstickstoffgehalt 0,22 % betrug. Bei normaler Fütterung wird der Gesamtstickstoffgehalt auch im Pansen von Rindern rund 0,3 % betragen oder betragen können, wie dies auch von *Gaus* angegeben wird.

Nach den Ergebnissen meiner direkten Zählung errechnet sich nun der Anteil des Bakterienstickstoffs am Gesamtstickstoffgehalt des Pansens, diesen zu 0,3 % angenommen, zu rund 3,5 %, das ist rund ein Drittel der von *Schwarz* und *Mangold* (2) gefundenen Werte, worauf noch zurückzukommen sein wird.

Wenn nun bei Amidfütterung der Eiweißbedarf zu einem Viertel durch Bakterieneiweiß ersetzt werden soll, so müßten je 1 g Panseninhalt von 0,3 % N (also 0,75 mg Bakterien-N in 1 g) 93,3 Milliarden Bakterien verdaut werden, demnach bei einer Verdauung von 85 % 110 Milliarden Bakterien in 1 g Panseninhalt vorhanden sein bzw. täglich zuwachsen. Diese Menge würde rund das Neunfache der von uns beobachteten Menge sein.

Nach *Gaus* beträgt der Eiweißbedarf einer Kuh täglich rund 1,2 kg; davon würden nach unseren Zählungen täglich 23,24 g, also rund 2 % durch Bakterieneiweiß gedeckt werden, bei normaler Fütterung. Legt man diesen Wert von *Gaus* dem Stickstoffgehalt des Pansens zugrunde, so würde man, 40 kg täglichen Durchgang angenommen, auf einen N-Gehalt des Pansens von 0,48 % kommen. Wenn davon ein Viertel in Form von Bakterienstickstoff gedeckt werden sollte, also 1,2 mg N je 1 g Panseninhalt, so würde man 150 Milliarden Bakterien je 1 g

Panseninhalt als resorbierbar bzw. 176,5 Milliarden Gesamtbakterien (davon 85 % resorbierbar) vorfinden müssen.

Nach den Stickstoffbestimmungen von *Schwarz* im Pansen von Rindern (Gesamt-N 0,13 %, davon 11,7 % Anteil der Bakterien) müßte 1 g Panseninhalt rund 19 Milliarden Bakterien enthalten, von denen 16,15 Milliarden (= 85 %) verdaut würden. Mit 40 kg Panseninhalt würden also täglich 32,4 g Bakterieneiweiß resorbiert werden. Diese Zahl entfernt sich nicht weit von meiner eigenen (23,24 g), was augenscheinlich damit zusammenhängt, daß in beiden Fällen Schlachthaustiere zur Untersuchung kamen, die zuletzt schlecht ernährt waren.

Legt man die Zahlen von *Mangold* (2) mit einem etwa doppelt so hohen Stickstoffgehalt im Pansen zugrunde, so kommt man zu einer doppelt so hohen Menge an resorbiertem Bakterieneiweiß, also zu etwa 65 g je Tier und Tag. Das würden also bei diesem Stickstoffgehalt des Pansens die rund 10 % des Stickstoffs sein, die im Bakterieneiweiß nach *Mangold* (2) festgelegt sind.

Die von mir gefundene Zahl von 23,24 g Eiweiß je Tier und Tag, die ich aus meinen Bakterienzählungen berechnete, ist nun zweifellos zu niedrig. Es seien die hierbei in Frage kommenden Punkte aufgeführt:

1. Die Stäbchen wurden, wie die Kokken, nur zu 1 μ^3 angenommen; sie sind aber zweifellos größer. Da das Verhältnis der Stäbchen zu den Kokken nach Tabelle VII sowohl nach Platten- wie auch nach direkter Zählung fast genau 1 : 4,5 ist, so würde also eine um den 4,5ten Teil von 23,24 g Eiweiß, also um 5,17 g höhere Zahl angenommen werden müssen, wenn man für die Stäbchen ohne großen Fehler den doppelten Inhalt annimmt. So kämen mithin noch 5,17 g Eiweiß zu der obigen Zahl, die sich damit auf 28,41 g erhöhen würde.

2. Auch durch die direkte Zählung konnten nicht alle Bakterien erfaßt werden, da die bereits in die Pflanzenzellen eingedrungenen Bakterien nicht restlos entfernt werden konnten, somit mit den Futterteilen bei der Vorbereitung zur Zählung beseitigt wurden. Diese Menge habe ich auf ungefähr 25 % geschätzt, so daß die Eiweißzahl eine weitere Erhöhung um 23,24/4 = 5,65 erfahren würde. Damit würde die tägliche Eiweißzahl aus Bakterien auf 34,06 gestiegen sein.

3. Es wurde schon gesagt, daß meine Zählungen an zuletzt schlecht gefütterten Schlachthaustieren vorgenommen wurden. Auch aus diesem Grunde sind meine Zahlen zu niedrig ausgefallen. Doch wage ich nicht, hier eine entsprechende Schätzung anzugeben. Doch sei darauf aufmerksam gemacht, daß gerade dieser Punkt (neben Punkt 5, S. 466) sehr wesentlich erscheint; eine Verdoppelung der Bakterienzahl würde unsere obigen Berechnungen ebenfalls verdoppeln. Hinter derartigen Erhöhungen würde die Bedeutung der übrigen wohl weit zurückbleiben.

4. Ein sehr wesentlicher Punkt schien weiterhin zu sein, daß die Höhe der Resorption vom Pansen zum Dünndarm nicht bekannt ist, sondern bei beiden 1 g = 1 g gesetzt werden mußte. Würde man diese kennen, so müßte natürlich die Differenz der Pansen- zu den Dünndarmbakterien größer werden, somit die Menge der resorbierten Bakterien weiter steigen.

Eine nähere Betrachtung zeigt indessen, daß hierdurch die Menge des resorbierten Bakterien-Stickstoffs wider Erwarten nur ganz unwesentlich höher würde. Das liegt an der geringen Bakterienzahl des Dünndarms, die ich zu 1,364 Milliarden je 1 g frischen Inhalts ermittelte (Tabelle XVI). Angenommen, es würde von Pansen zu Dünndarm bzw. von den beiden Stellen, an denen die Zählungen vorgenommen wurden, eine Resorption von 50 % des Futters stattfinden, so würde 1 g Panseninhalt 0,5 g Dünndarminhalt entsprechen, die Resorption der im Dünndarm gefundenen Bakterien sich somit um 1,364/2 = 0,682 Milliarden erhöhen müssen. Das ergäbe also eine Steigerung der resorbierten Menge an Bakterien um nur 5,9 % (bezogen auf die 11,616 Milliarden Bakterien, um die der Dünndarm gegenüber dem Pansen abgenommen hat), also eine Steigerung der resorbierten Stickstoffmenge von 23,24 um 11,8 % = 1,38 g. Im höchsten Falle, bei Resorption *aller* Bakterien, könnte dieser Wert lediglich auf das Doppelte, also auf 2,75 g steigen.

5. Die gefundenen Bakterienzahlen sind die im Augenblick erfaßbaren. Darüber hinaus verändert sich diese Zahl natürlich im Laufe des Tages. Im Pansen wird hierbei das Gefressenwerden durch Protozoen eine Rolle spielen, wobei dann entsprechend Bakterien nachwachsen. Diese Menge erscheint natürlich nicht in unserer Zahl, deren wirklicher Wert sich dadurch erhöhen müßte. Dieser Wert kann so hoch veranschlagt werden, wie die tägliche Resorption an Protozoeneiweiß beträgt. Nach *Mangold* (2) soll dessen Menge 10—20 % der im Pansen vorhandenen Gesamtmenge an Eiweiß sein, also etwa ebensoviel oder etwas mehr als das in Bakterien festgelegte Eiweiß. *Mangold* (2) (Bd. 2, S. 182) nimmt auf Grund vorliegender Untersuchungen die Menge der resorbierten Protozoen zu 7 % an, gemäß der Feststellung, daß sich jeweils 7 % in Teilung befinden, somit, bei Konstanz der Protozoenzahl so viel weggenommen werden müssen, wie zuwachsen. Diese Zahl dürfte indessen zu niedrig sein. Denn 7 % sind jeweils im Augenblick in Teilung. Täglich werden sich jedenfalls mehr Individuen teilen. Wenn nämlich die Zahl der Protozoen im Pansen konstant bleibt, so müssen so viele von ihnen nachwachsen, wie in dem Durchgangsfutter enthalten sind, also mehr als 7 %. Auch durch diese Betrachtung kommen wir demnach zu dem Schluß, daß die wirkliche zur Resorption gelangende Bakterienzahl höher sein muß, als von mir gefunden wurde. Eine Verminderung könnte allerdings wieder in Frage kommen, wenn

Protozoen im Pansen absterben und sich von deren Eiweißstoffen wieder Bakterien entwickeln, was ich nicht entscheiden kann.

6. Nicht übersehen werden darf, daß auch noch ein Umstand vorkommt, der wieder zu einer Verminderung der Bilanz des Bakterien-Stickstoffs führen muß, nämlich die vom Dünn- zum Dickdarm beobachtete *Zu*nahme der Bakterien auf fast den Wert im Pansen. Umgekehrt wie beim Übergang vom Pansen zum Dünndarm würde sich aber hier die erfolgte Resorption des Futters (also 1 g nicht gleich 1 g) so auswirken, daß die Verschlechterung der Bilanz nicht so stark ist, wie es bei alleiniger Gleichsetzung von 1 g = 1 g scheinen könnte. Unter dieser Annahme würde die Zunahme der Bakterien (Tabelle XV) 10,25 Milliarden betragen = 0,082 mg Bakterien-N = 3,28 g auf 40 kg den Pansen passierende Futtermasse je Tier und Tag oder 20,5 g Eiweiß. Nehmen wir hingegen eine Resorption des Futters zum Dickdarm von 75 % an, so würde sich diese Zunahme an Eiweiß auf nur ein Viertel, also auf 5,13 g Eiweiß stellen, eine Menge, die also doch nicht so stark ins Gewicht fällt.

Zusammengefaßt kann gesagt werden, daß sich unter Berücksichtigung aller Umstände die von mir gefundenen Bakterienzahlen bzw. der daraus errechnete Stickstoff ziemlich den von anderen Autoren für den Anteil von Bakterien- und Protozoen-Stickstoff am Gesamtstickstoff des Pansens nähern würden. Wie weit dies der Fall sein wird, kann zur Zeit noch nicht entschieden werden, zumal, wie oben eingehend dargelegt wurde, die mit Hilfe der verschiedenen Verfahren festgestellten Bakterieneiweißwerte sicherlich zu hoch sind und vor allem der Verdacht vorliegt, wie u. a. S. 460 ausgeführt wurde, daß diese Zahlen wenigstens teilweise durch zufällige Fehlerkompensationen zustande kommen könnten.

Die vorliegenden Versuche beschäftigen sich mit der Bakterienflora des normal gefütterten Tieres. Sie sagen über die Verhältnisse bei Amidfütterung nichts aus. Diesbezügliche Versuche, die mittels direkter Zählung der Bakterien bei amidgefütterten Tieren Hinweise ergeben sollten, konnten leider wegen der Zeitverhältnisse noch nicht durchgeführt werden. Wenn sich auch bei Amidfütterung keine Zunahme von Protozoen ergab [*Mangold*, (2) Bd. 2, S. 171], so würde eine Zunahme an Bakterien, wie sie z. B. von *W. Klein* unter diesen Verhältnissen angegeben wird, von rein bakteriologischen Gesichtspunkten aus nicht eben überraschend sein. Die Frage würde indessen sein, ob diese Zunahme bzw. die zum Dünndarm erfolgende Abnahme bzw. Resorption solche Werte erreicht, daß man diese als wesentlich ansprechen könnte.

Daß Amide von Pansenbakterien gut verwertet werden können, wurde auch in den vorliegenden Versuchen gezeigt. Das gilt nicht nur

für die leicht züchtbaren, vielleicht aus dem Futter stammenden Stäbchen, sondern auch für die offenbar spezifische Pansenflora der Kokken, wie die Versuche der Tabelle XI zeigten. Als wesentlich ist hierbei noch festzustellen, daß die Ökonomie der Eiweißbildung durch die Bakterien recht hoch ist, wie gezeigt wurde, selbst unter streng anaeroben Verhältnissen. Erst dadurch würde aber eine gute Verwertung des Futters verständlich werden können. Denn wenn zu viel Kohlenhydrat aufgewendet werden muß, um eine bestimmte Menge Eiweiß zu bilden, so müßte der Gesamtwert des Futters sich stark verringern, damit wohl auch die Eiweißwirkung.

Wenn ich nun auch nach dem Gesagten einer Amidfütterung mit verstärkter Bildung von Bakterien im Pansen und entsprechender Zufuhr von Bakterieneiweiß keine ganz ungünstige Prognose stellen kann, wenn auch vorerst nur in bescheidenem Umfange, so dürften doch noch zahlreiche andere tierphysiologische Erscheinungen mit hineinspielen, die das Bild ändern könnten. Entscheidend wird immer der Tierversuch sein. Von bakteriologischer Seite kann nichts anderes geschehen, als die von dieser Seite her erkennbaren *Möglichkeiten* aufzuzeigen; in diesem Sinne mögen alle meine Ausführungen aufgefaßt werden.

Zusammenfassung.

Die Änderung der Bakterienmasse in den Verdauungsorganen des Rindes wurde in Pansen, Dünn- und Dickdarm mit verschiedenen Methoden quantitativ bestimmt. Das Zentrifugier- und namentlich das Filtrationsverfahren ergaben offenbar zu hohe Werte an Bakterienmasse, diese als Trockenmasse bestimmt. Plattenzählung und Zählung nach dem Verdünnungsverfahren ergaben viel zu niedrige Werte. Die direkte mikroskopische Zählung ergab je 1 g frischen Inhalts im Pansen 13,0, im Dünndarm 1,36 und im Dickdarm 12,31 Milliarden Bakterien.

Die danach berechnete Menge an Bakterieneiweiß, die dem Tier durch Verdauung der verschwundenen Bakterien zur Verfügung stehen könnte, ergab 23,24 g, d. h. etwa 2 % der Menge, die dem Tier normalerweise täglich zur Verfügung stehen müßte. Infolge verschiedener Umstände (S. 465ff.) ist diese Zahl indessen zu niedrig.

In allen Darmabschnitten beträgt das Verhältnis der vorhandenen Stäbchen zu den Kokken etwa 1 : 4,5. Die Kokken, die wohl die spezifische Bakterienflora darstellen, konnten jedoch nur in wenigen Passagen gezüchtet werden.

Alle Darmbakterien besitzen eine hohe Ökonomie der Eiweißbildung; der Eiweißkoeffizient (die auf 100 verarbeitetes Kohlenhydrat gebildete Menge Eiweiß) schwankt zwischen 3,1 und 14. Auch bei streng anaerober Züchtung ist diese Ökonomie hoch, der Eiweiß-

koeffizient betrug in diesem Falle 4,1—8,0, bei dem anaeroben Cellulosezersetzer 7,7.

Es wird erörtert, welche Folgerungen sich aus den bakteriologischen Feststellungen für die Frage der Eiweißbildung durch Bakterien bei Amidfütterung des Tieres ergeben könnten.

Literatur.

P. Ankersmit, Inaug.-Dissertation, Lausanne 1905. — *W. Benecke*, Bau und Leben der Bakterien. — *R. Burri*, Centralbl. f. Bakt. II, **8**, 533, 1902. — *F. Czapek*, Biochemie d. Pflanzen **2**, 712, 1905. — *Gaus*, Angew. Chemie **50**, Nr. 38, S. 755, 1937. — *O. Hagemann*, Landw. Jahrbücher **49**, 477, 1891. — *W. Henneberg*, Centralbl. f. Bakt. II, **55**, 254, 1922. — *A. Klein* (1), ebenda I, **27**, 834, 1901. — *A. Klein* (2) u. *F. Visser*, Folia Mikrobiologica, II. Jahrg., 201, 1913. — *G. Klein*, Handb. d. Pflanzenanalyse **2**, 54, 1932. — *W. Klein* u. Mitarbeiter, Zeitschr. f. Züchtung, Reihe B: Tierzüchtung u. Züchtungsbiologie **35**, 379, 1936; **37**, 93, 1937; **39**, 135, 1937. — *H. Kreipe*, Inaug.-Dissertation, Kiel 1927. — *W. Kruse*, Allgem. Mikrobiologie 1910, S. 55. — *J. König*, Untersuchung landwirtschaftl. u. gewerblich wichtiger Stoffe 1906, S. 194. — *F. Löhnis*, Handb. d. landwirtschaftl. Bakteriologie, 1. Aufl. Jena, G. Fischer, 1910. — *E. Mangold* (1) u. *Schmitt-Krahmer*, Biochem. Zeitschr. **191**, 414, 1927. — *E. Mangold* (2), Handb. d. Ernährung u. d. Stoffwechsels d. landwirtschaftl. Nutztiere **2**, 1929. — *R. Meyer* u. *K. Pietschmann*, Methoden der Anaerobenzüchtung. Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmethoden, Abt. XII, Teil 2, S. 1513, 1939. — *M. Müller*, Pflügers Arch. **112**, 245, 1906. — *G. Pellegrini*, diese Zeitschr. **9**, 545, 1938. — *A. Peppler*, Centralbl. f. Bakt. I, **29**, 347, 1901. — *A. Rippel* (1), diese Zeitschr. **7**, 210, 1936. — *Derselbe*, (2) ebenda **8**, 41, 1937. — *A. Rippel* (3), *G. Behr* u. *K. Nabel*, ebenda **9**, 375, 1938. — *A. Rippel* (4) u. *K. Nabel*, ebenda **10**, 359, 1939. — *P. Rona*, Prakt. d. physiolog. Chemie, 1. Teil, 1926. — *C. Schwarz*, Biochem. Zeitschr. **156**, 130, 1925. — *J. Strassburger*, Zeitschr. f. klin. Med. **46**, 6, 1902. — *E. Wild*, J. f. Landwirtschaft **22**, 1, 1874. — *N. Zuntz*, Pflügers Arch. **49**, 477, 1891.

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.)

Die Schreibweise von Bacillus megaterium de Bary.

Von **August Rippel.**

(Eingegangen am 9. September 1940.)

Während *de Bary* die Schreibweise *Bacillus megaterium* anwandte, findet man später vielfach die Form *B. megatherium.* Es sind zwei Ableitungen möglich: 1. von μέγα βακτήριον durch Zusammenziehung unter Weglassen der Silbe βακ = *megaterium,* großes Stäbchen; 2. von μέγα θηρίον = *megatherium*[1], großes Tier. *De Barys* Bemerkung[2] (S. 499) — „man gestatte die Einführung dieses im Laboratorium seit langem eingebürgerten Namens für die stattliche Species" — deutet an, daß das in seinem Laboratorium durch *Eduard Fischer* entdeckte und von *de Bary* erstmalig beschriebene Bakterium[2] einen Laboratoriums-Scherznamen führte, etwa „Großtier" oder „Großvieh". In Anlehnung an den Namen des fossilen Riesenfaultieres, des *Megatherium,* glaubte man, in der *de Bary*schen Schreibweise ein Versehen erblicken zu müssen und schrieb infolgedessen mit h, also *B. megatherium.* Das ist auch der Sinn der Ausführungen von *Breed*[3], der auf Grund einer mündlichen Angabe von *Winogradsky,* der seinerzeit bei *de Bary* arbeitete, diese Schreibweise für richtig hielt („big animal").

Nun liegen die Dinge allerdings nicht ganz so. Wie mir der soeben verstorbene Geheimrat *Behrens* mitteilte, der selbst leider nicht mehr zur Abfassung eines Berichtes gekommen ist, haben ihm sowohl *A. Koch* wie *F. Wortmann,* die ebenfalls anfangs der 80er Jahre bei *de Bary* arbeiteten, mündlich bestätigt, daß *de Bary* ausdrücklich die Ableitung nach 1. (also *megaterium*) als die von ihm gewollte erklärte. Dies bestätigt dem Verfasser aus persönlicher Erinnerung freundlichst auch *F. Oltmanns* und auch *W. Benecke* teilt ihm freundlicherweise mit, daß ihm *M. Büsgen* ebenfalls ausdrücklich die von *de Bary* gewollte Ableitung nach 1. bestätigte. *De Bary* hat denn auch den später konstruierten „Druckfehler" in seinen später erschienenen „Vorlesungen über Bacterien" nicht geändert, und auch die Schule *de Barys* hat die von ihm gegebene Schreibweise beibehalten.

Somit liegen die Dinge offenbar so, daß *de Bary* zwar von dem Spitznamen im Laboratorium („Großtier" — „*Megatherium*") ausging, aber augenscheinlich, vielleicht in humorvoller Freude an dem Wortspiel, die Bezeichnung in Großstäbchen = *megaterium,* also in die wissenschaftlich einwandfreie Form abbog; denn er als Botaniker wollte zweifellos den Organismus auch als botanisches Objekt hinstellen.

Nach Würdigung der ganzen Sachlage besteht somit kein Grund, die ursprüngliche Schreibweise *B. megaterium.* weil irrtümlich, zu ändern. Gründe der Pietät rechtfertigen wohl diese Mitteilung über eines der ersten botanisch genauer beschriebenen Bakterien.

[1] In *Bergeys* Manual of determinative Bacteriology, 5. Aufl., 1939, wird S. 665 von dem *lateinischen* (!) mega und therium abgeleitet! — [2] *A. de Bary,* Vergleichende Morphologie der Pilze, Mycetozoen und Bacterien. Leipzig, Engelmann, 1884. — [3] *R. S. Breed,* Science 70, 480, 1929.

Autorenverzeichnis.

Sachverzeichnis.

Vorbemerkung: Wegen der verschiedenen Handhabung der Bakterienbezeichnungen sind die Namen *Bacillus* und *Bacterium* (teilweise auch *Pseudomonas*) unter einem Stichwort zusammengefaßt, wobei für die Artbezeichnung die Neutrumform gewählt ist (z. B. *B. subtile* usw.). Eine wissenschaftliche Stellungnahme ist damit nicht zum Ausdruck gebracht.

Pflanzen-, Tier- und Personennamen sind *kursiv* gedruckt; neue Gattungs- und Artnamen sind durch **Fett**druck hervorgehoben. **Fett**druck der Seitenzahlen bedeutet, daß der Gegenstand ausführlicher behandelt ist.

INDIAN
AGRICULTURAL RESEARCH INSTITUTE
LIBRARY
New Delhi

Issue Date	Issue Date	Issue Date	Issue Date